



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Estudio de la función de PSD-95 en el desarrollo de nuevas neuronas generadas en el hipocampo de cerebro de ratón adulto

PATRICIA VALENTINA JORQUERA ÁLVAREZ

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra. Lorena Varela-Nallar, en el Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación.

Dra. Lorena Varela-Nallar
Directora de Tesis

Dr. Álvaro Elorza
Comisión de Tesis

Dra. Brigitte van Zundert
Co-directora de Tesis

Dra. Claudia Riedel
Comisión de Tesis

**Santiago - Chile.
Año 2017.**



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Estudio de la función de PSD-95 en el desarrollo de nuevas neuronas generadas en el hipocampo de cerebro de ratón adulto

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Directora de Tesis: Dra. Lorena Varela-Nallar
Co-directora de Tesis: Dra. Brigitte van Zundert
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Patricia Valentina Jorquera Álvarez
Santiago, Chile.
Junio, 2017.

Mi tesis va dedicada a mis padres, Patricia y Gerónimo, por ser el pilar de nuestra familia, por su amor, por su comprensión y por su apoyo incondicional brindado durante mi vida y en estos largos años de carrera. Está terminado su trabajo con mis hermanos y conmigo, sé que están orgullosos de nosotros por todo lo logrado. A mis hermanos, Alejandra y Leonardo, por su apoyo constante y guía en el camino de la vida. A mis sobrinos, Sergio e Isidora, por alegrarme día a día y enseñarme el amor de tía.

Muchas gracias, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Lorena Varela por haberme aceptado en su laboratorio para realizar mi tesis de magister, por su guía en el camino científico y por los conocimientos entregados durante mis años en su laboratorio. Además agradecer a los compañeros del laboratorio y especialmente a los amigos que hice en él, Fernanda Guerrero, Joaquín Jensen y Miguel Guerra, por ser un apoyo importante en el largo y difícil camino del tesista.

El agradecimiento más importante es para mis padres. Patricia y Gerónimo, y hermanos, Alejandra y Leonardo. Gracias por su amor, por el apoyo incondicional en mi vida y en mi formación académica, por sus consejos de siempre seguir adelante y lograr mis sueños, por enseñarme a ser una mejor persona y profesional, todo esto se los debo a ustedes... Trabajo logrado.

Gracias a mi pololo, amigo, compañero, Christian Robles, partimos el camino universitario casi juntos, sufrimos con los ramos y la tesis, pero ya está llegando todo a su fin. Partimos una historia hace muchos años y ahora podemos contarla juntos. Gracias por tu comprensión, ayuda y apoyo en lo profesional y en la vida, eres increíble.

Finalmente, agradecer al proyecto Fondecyt 1150933, Núcleo UNAB DI-603-14/N y Núcleo UNAB DI-4-17/N por el financiamiento.

ÍNDICE

1. Resumen.....	8
2. Abreviaciones.....	9
3. Introducción.....	12
3.1 Neurogénesis hipocampal adulta.....	12
3.2 Integración sináptica de las nuevas neuronas GC.....	15
3.3 Funciones de PSD-95 en sinapsis glutamatérgica y plasticidad hipocampal.....	19
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos.....	23
6. Diseño experimental.....	24
7. Materiales y métodos.....	26
7.1 Animales.....	26
7.2 Líneas celulares.....	26
7.3 Purificación de vectores retrovirales.....	27
7.4 Extracción de RNA y transcripción reversa.....	28
7.5 qRT-PCR.....	29
7.6 Western blot.....	30
7.7 Transfección de células N2a con Lipofectamina 3000.....	31

7.8 Transfección de células HEK293T y concentración de retrovirus.....	31
7.9 Título viral.....	32
7.10 Cirugía estereotáxica.....	33
7.11 Perfusión transcardial y obtención de cortes coronales de cerebros.....	34
7.12 Inmunofluorescencia de tejidos.....	34
7.13 Análisis de las nuevas células infectadas.....	35
7.14 Análisis de la migración celular, largo total dendrítico e intersecciones dendríticas.....	36
7.15 Análisis de Sholl.....	36
7.16 Análisis estadístico.....	36
8. Resultados.....	38
8.1 La proteína de la densidad post-sináptica PSD-95 se expresa en N2a, AHPs e hipocampo de ratón adulto.....	38
8.2 Silenciamiento de PSD-95 en línea celular N2a utilizando un shRNA.....	40
8.3 Concentración de retrovirus pMKO e inyección en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto.....	43
8.4 Silenciamiento de PSD-95 en células N2a mediante retrovirus utilizando el vector pSIREN-shPSD95.....	45
8.5 Análisis del efecto del silenciamiento de PSD-95 sobre etapas tempranas de la neurogénesis.....	51
8.6 El silenciamiento de PSD-95 no afecta el desarrollo del árbol dendrítico pero si la formación de espinas dendríticas.....	56

9. Discusión.....	61
10. Conclusión y proyecciones.....	66
11. Referencias.....	67

1. RESUMEN

El hipocampo es una estructura cerebral que sufre continuos cambios celulares y moleculares en respuesta a los estímulos, lo que se conoce como plasticidad. Además, en esta región continuamente se generan nuevas neuronas, proceso denominado neurogénesis, lo que incrementa aún más la plasticidad del hipocampo. La neurogénesis en el adulto ocurre a partir de células madres neurales localizadas en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. Las nuevas neuronas generadas en el hipocampo adulto se integran sinápticamente en el circuito hipocámpal y son importantes para procesos de aprendizaje y memoria.

La sinapsis excitatoria glutamatérgica se caracteriza por ser una sinapsis asimétrica. La membrana de la espina dendrítica post-sináptica tienen una región electrodensa denominada densidad post-sináptica (PSD), que consiste en un complejo multiprotéico que incluye los receptores AMPA y NMDA, además de moléculas de andamiaje como PSD-95, fundamental para la interacción entre los receptores y las moléculas de neurotransmisión. En neuronas hipocámpales, PSD-95 es importante para el desarrollo del árbol dendrítico, formación de espinas dendríticas, maduración y desarrollo de las sinapsis glutamatérgica.

En base a estos antecedentes, en la presente tesis se propuso como hipótesis que **“PSD-95 regula el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo de ratón adulto”**. Con el fin de sustentar esta hipótesis se planteó como objetivo general “Determinar *in vivo* el papel de PSD-95 en el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas en las nuevas neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto”. Para llevar a cabo los objetivos planteados se generó un retrovirus que expresa un shRNA contra PSD-95 y se analizó su efecto *in vivo* mediante la inyección del retrovirus en el hipocampo mediante cirugía estereotáxica. Se analizaron las nuevas neuronas a las 2, 4 y 6 semanas post-inyección. Se determinó que el silenciamiento no afectó significativamente la arbolización dendrítica, pero si se observó que las nuevas neuronas deficientes en PSD-95 presentaban dendritas más delgadas y con menor volumen de espinas dendríticas. Los resultados obtenidos indican que la deficiencia de PSD-95 no afecta la generación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto, pero si la formación de espinas dendríticas, evento fundamental en la integración sináptica de las nuevas neuronas.

2. ABREVIACIONES

AHPs	Progenitores hipocampales adultos
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
AMPA	Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Cornus ammonis
cDNA	DNA complementario
CMV	Promotor citomegalovirus
DCX	Doblecortina
DG	Giro dentado
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio de cultivo, dulbecco modified eagle medium
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfato
EB3	End-binding protein 3
EMEM	Medio de cultivo, eagle minimum essential medium
FBS	Suero fetal bovino
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa
GC	Células granulares
GCL	Capa de células granulares
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía
GFP	Proteína fluorescente verde
H	Hilio
HEK	Células embrionarias de riñón humano
LTP	Potenciación a largo plazo

MAGUK	Guanilato kinasas asociadas a membrana
MEM-NEAA	Aminoácidos no esenciales
ML	Capa molecular
MMLV	Virus de la leucemia murina moloney
mRNA	RNA mensajero
N2a	Línea celular neuroblastoma de ratón
NeuN	Proteína nuclear neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NSCs	Células madre neuronales
OptiMEM	Medio de cultivo, minimal essential medium
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PFA	Paraformaldehído
PEI	Polietilenimina
PSD	Densidad post-sináptica
PSD-95	Proteína de la densidad post-sináptica 95
PVDF	Polivinilideno difluorido
qRT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real
RIPA	Tampón para ensayo de radioinmunoprecipitación
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RMS	Corriente migratoria rostral
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-M-MuLV	Transcriptasa reversa M-MuLV
RT-PCR	PCR en tiempo real
SAP-102	Proteína asociada a la sinapsis 102

SDS-PAGE	Sodio dodecil sulfato – electroforesis en gel de poliacrilamida
SGZ	Zona subgranular
shC	Short hairpin contra control
shPSD95	Short hairpin contra PSD-95
shRNA	Short hairpin RNA
SVZ	Zona subventricular
TAPs	Progenitores de amplificación transiente
VSV-G	Virus de estomatitis vesicular
wpi	Semanas post-inyección
ZsG	ZsGreen, proteína fluorescente verde de Zoanthus

3. INTRODUCCIÓN

El cerebro es capaz de recibir diversos estímulos que son reconocidos por las distintas cortezas cerebrales, lo que le permite cambiar las conexiones que ocurren en él. Dentro de este importante órgano se encuentra el hipocampo, región que presenta continuos cambios moleculares y celulares luego de la llegada de nuevos estímulos, lo que subyace a procesos de aprendizaje y memoria. Los estímulos que son recibidos por el cerebro pueden generar nuevas conexiones entre las neuronas, proceso denominado sinaptogénesis (Hsieh, 2012), y modificaciones entre conexiones ya existentes. A través de cambios moleculares, tales como la modificación del número de receptores, las conexiones nuevas y las preexistentes pueden ser potenciadas lo que fortalece las redes neuronales, o disminuidas llevando consigo a la pérdida de las conexiones. Además, ocurren cambios estructurales de las neuronas, tales como la formación de espinas, cambios en la estructura de dendritas y de axones (Kolb and Whislaw, 1998). El fenómeno de constante remodelamiento y cambios dinámicos que se produce dentro de nuestro cerebro se conoce como plasticidad neuronal, la cual es la base del aprendizaje (Bast *et al.*, 2007) y es requerida para la formación de memorias (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2007).

Además de estos cambios estructurales y moleculares, se ha establecido que en la generación de nuevas memorias es importante el proceso de formación de nuevas neuronas funcionales. A este proceso se le denomina neurogénesis, y contribuye a la continua remodelación del circuito hipocampal, incrementando aún más la plasticidad del hipocampo (Hsieh, 2012).

3.1 Neurogénesis hipocampal adulta

La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas a partir de células madres neurales (*neural stem cells*, NSC). Este proceso se observa tanto en estados de desarrollo embrionario como también en el cerebro adulto de mamíferos (Ming and Song, 2005). Dicho proceso ha sido conservado durante la evolución, lo que permite su

observación tanto en invertebrados como vertebrados, donde entre otros animales, se encuentran los seres humanos (Eriksson *et al.*, 1998).

En el cerebro adulto, este es un proceso altamente regulado que ocurre en dos regiones específicas: la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo, donde a partir de NSC se forman nuevas células granulares que se integran al circuito hipocampal preexistente (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002; Ming and Song, 2011); y la zona subventricular (SVZ) en la pared de los ventrículos laterales, donde las nuevas neuronas migran por la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio donde se diferencian a interneuronas (Suh *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008; Ming and Song, 2005; Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2009) (Figura 1).

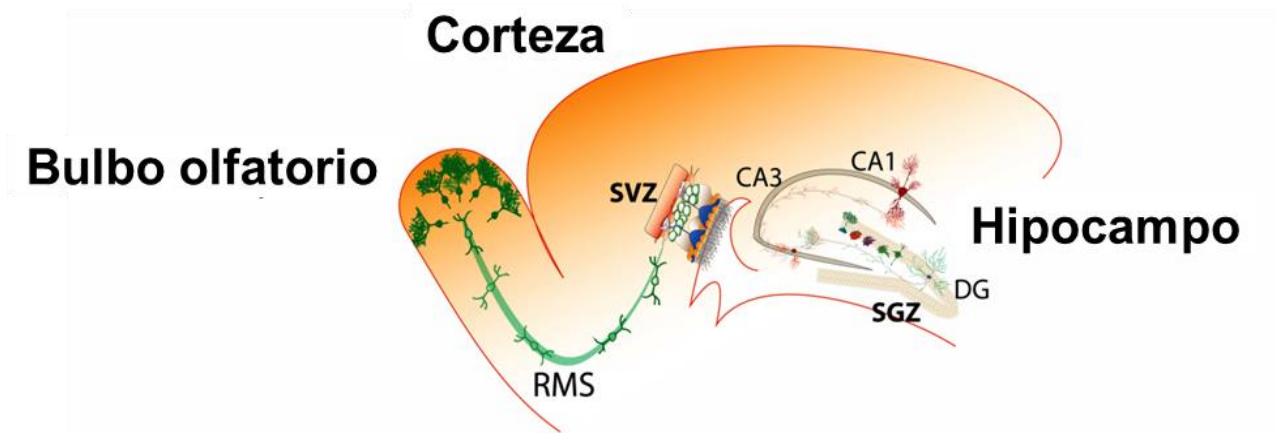


Figura 1. Zonas neurogénicas en el cerebro adulto. Representación de las regiones neurogénicas en el cerebro adulto de ratón; se observan la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado (DG) del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (adaptado de Varela-Nallar and Inestrosa, 2013).

La neurogénesis hipocampal adulta consta de varias etapas: proliferación de NSCs, diferenciación hacia el linaje neuronal, migración, maduración e integración (Hsieh, 2012) (figura 2a). Específicamente en la SGZ, las células quiescentes tipo glía radial que se extienden a través de la capa de células granulares (RGL o células tipo 1 horizontal) (Lugert *et al.*, 2010) mediante un proceso de división asimétrica se autorenewan y generan progenitores de amplificación transiente (TAP o célula tipo 2), que se caracteriza

por su alta capacidad de proliferación y diferenciación. Posteriormente las células tipo 2 diferencian hacia el linaje neuronal y generan neuroblastos (células tipo 3) (Gage, 2000). Luego se convertirán en neuronas inmaduras y permanecen en el DG, migrando por el primer tercio de la capa granular (Esposito *et al.*, 2005; Kempermann *et al.*, 2003). Luego de un periodo de maduración, estas células se convierten en células granulares dentadas (GCs), que extienden sus dendritas por la capa granular y luego por la capa molecular del giro dentado del hipocampo y proyectan sus axones a través del hilio para conectarse con neuronas de la región CA3 del circuito hipocampal (figura 2b) (Zhao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Mathews *et al.*, 2010; van Praag *et al.*, 2002). Por lo tanto son células que maduran y se integran al circuito neuronal.

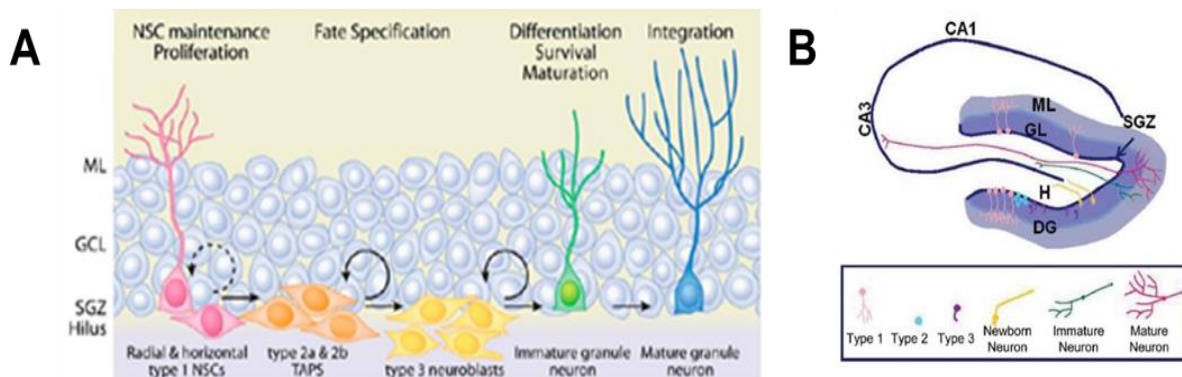


Figura 2. Etapas de la neurogénesis hipocampal adulta en SGZ. **A.** Representación donde se observan la zona subgranular (SGZ), la capa de células granulares (GCL) y la capa molecular (ML), además de las etapas principales necesarias para la formación de una neurona funcional. A partir de células quiescentes tipo glial radial (células tipo 1) se generan progenitores de amplificación transiente (TAPs), las que al caracterizarse por su alta tasa de proliferación pueden convertirse en neuroblastos (células tipo 3), para finalmente llegar a ser una neurona madura que se integra en el circuito hipocampal (Adaptado de Hsieh *et al.*, 2012). **B.** Representación esquemática de la generación de nuevas células granulares en el giro dentado (DG); ML, capa molecular; GL, capa granular; H, hilio (Adaptado de Varela-Nallar *et al.*, 2010).

Las distintas etapas de la neurogénesis se pueden reconocer mediante proteínas marcadoras específicas que son expresadas en etapas determinadas (Encinas *et al.*, 2006), las que permiten identificar el estadio en que se encuentran. Las células tipo 1 se caracterizan por expresar la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) (Hagemann *et al.*, 2013), Nestin (Yamaguchi *et al.*, 2000), que es una proteína de filamento intermedio tipo

IV que se expresa solo en células progenitoras neurales (Lendahl *et al.*, 1990), y Sox2 que es un factor de transcripción importante para la mantención y auto-renovación de células madres (Archer *et al.*, 2011). Las células tipo 2 expresan Sox2 y Nestin y no expresan GFAP (Seri *et al.*, 2004). Las células tipo 3 se caracterizan por expresar la proteína de unión a microtubulos doblecortina (DCX) (Bonaguidi *et al.*, 2011; Suh *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2003). Finalmente, las neuronas maduras expresan NeuN y Calbindin y dejan de expresar DCX (figura 4).

3.2 Integración sináptica de las nuevas GC

Las nuevas neuronas, que se integran al circuito hipocampal preexistente, se convierten en neuronas funcionales que responden a estímulos provenientes de la corteza entorrinal. Para esto, las nuevas neuronas establecen conexiones sinápticas con neuronas preexistentes y, una vez maduras, presentan propiedades eléctricas glutamatérgicas similares a las células granulares que se generan durante el desarrollo del hipocampo (Toni *et al.*, 2007; van Praag *et al.*, 2002).

Las GC inmaduras poseen una excitabilidad mayor en comparación con las GC maduras. Éstas neuronas, establecen contactos sinápticos de tipo glutamatérgico, lo que concuerda con el aumento en la densidad de las protrusiones dendríticas y el aumento en las conexiones sinápticas (Toni *et al.*, 2007; Aimone *et al.*, 2014). La diversidad de circuitos sinápticos que presentan las nuevas GC permite la maduración de la sinapsis, la cual será una sinapsis glutamatérgica, sugiriendo que las proteínas sinápticas relevantes durante el desarrollo pueden estar afectando la integración y maduración de estas conexiones.

La sinapsis excitatoria en el cerebro de mamíferos es predominantemente mediada por el neurotransmisor glutamato, el cual es el más abundante dentro del sistema nervioso, mientras que la inhibición de la transmisión sináptica está dada por el neurotransmisor gamma-amino ácido butírico (GABA). Las sinapsis glutamatérgicas establecen contacto en alta proporción con espinas dendríticas, un compartimento post-sináptico que se caracteriza por presentar una región electrodensa denominada densidad post-sináptica (PSD), donde existe una alta densidad de receptores de glutamato como N-metil-d-

aspartato (NMDAR) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), además de moléculas reguladoras de la transmisión sináptica. Los NMDARs son componentes estables de la PSD, mientras que los AMPARs no lo son, por lo tanto controlan la actividad neuronal (Tomita *et al.*, 2001; Lüscher *et al.*, 1999; Beattie *et al.*, 2000; Ehlers, 2000; Lin *et al.*, 2000). Una de las proteínas sinápticas que tiene gran relevancia para la sinapsis glutamatérgica es la Proteína de Densidad Post-sináptica 95 (PSD-95), una proteína de andamio de la PSD que permite el anclaje de los receptores a la membrana e interactúa con diversas proteínas que regulan la neurotransmisión.

Los cambios en la morfología de las espinas dendríticas así como las modificaciones en la composición de la PSD se asocian a los procesos de aprendizaje y memoria (Steward and Schuman, 2001). Diversos estudios afirman que el aprendizaje dependiente del hipocampo regula la neurogénesis afectando la supervivencia de las nuevas neuronas (Epp *et al.*, 2013), regulando la morfogénesis de espinas y desarrollo de dendritas en las nuevas GC (Tronel *et al.*, 2010), y a su vez, la neurogénesis es importante para el aprendizaje y la memoria.

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio que se localiza en vesículas pre-sinápticas. Cuando la vesícula que transporta glutamato se fusiona con la membrana pre-sináptica este neurotransmisor es liberado al espacio sináptico e interactúa con los receptores que se encuentran tanto en la membrana pre como post-sináptica (Gallo and Ghiani, 2000; Sudhof, 1999; Nestler *et al.*, 2001; Zenisek *et al.*, 2000; Matthews, 2000). Dentro de los receptores que responden a este neurotransmisor se encuentran dos tipos: receptores ionotróficos y metabotróficos (Reith, 2000). Los receptores ionotróficos incluyen dentro de su estructura un canal por el cual fluyen iones como calcio, sodio y potasio, mientras que los receptores metabotróficos no forman canales pero si están involucrados en promover o inhibir cascadas metabólicas que pueden influir en la membrana, en el citoplasma o en el núcleo de las neuronas. En lo que respecta a las acciones de estos receptores, los receptores ionotróficos desencadenan fenómenos eléctricos de activación rápida, mientras que las acciones de los receptores metabotróficos son prolongadas, las que se pueden traducir en adaptaciones moleculares, donde se pueden encontrar la distribución de axones, tamaños celulares,

patrones de ramificación dendrítica y número de espinas, lo que se considera importante en los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad y memoria (Reith, 2000).

Dentro de los receptores ionotróficos de glutamato se encuentran los NMDAR que es estimulado por glutamato y NMDA; estos canales se abren y permiten el flujo de sodio y calcio dentro de la célula (Kennedy, 2000). Son complejos proteicos que contienen a lo menos una de sus isoformas NR1 o NR2 que participa como unidad fundamental, la cual se puede unir con subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. Pueden estar localizados en el terminal pre como en la post-sináptica, siendo más abundante en esta última (Seeburg *et al.*, 1994; Danysz and Parsons, 1998). También existen los AMPAR, los cuales poseen una canal que media la rápida aparición de un potencial post-sináptico excitatorio después de la liberación de glutamato. Los estudios demuestran que los receptores AMPARs, en contraste con los NMDARs, son usados más rápidamente en las sinapsis (Schnell *et al.*, 2002; Scannevin and Huganir, 2000; Ziff, 1999), y que la plasticidad sináptica implica un cambio rápido en el número de AMPAR en la sinapsis (Malenka and Nicoll, 1999; Zamanillo, 1999). Por lo tanto, al activarse los receptores NMDA y AMPA, se produce la entrada de calcio a la neurona post-sináptica, aumentando la concentración de este ion, lo que permite la inserción de más receptores en la membrana celular (Greer and Greenberg, 2008). Al ingresar calcio a la neurona post-sináptica se inicia una cascada de señalización que concluye con cambios estructurales y la expresión de nuevos genes lo que tiene como resultado el crecimiento dendrítico, desarrollo sináptico y plasticidad neuronal (Greer and Greenberg, 2008) (figura 3).

A lo largo del proceso de maduración de neuronas durante la neurogénesis adulta, las neuronas inmaduras presentan una excitabilidad mayor que las neuronas maduras lo que se debe en parte a una inhibición reducida por el neurotransmisor GABA, por lo tanto las neuronas inmaduras se activan con mayor facilidad que las neuronas maduras (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006). Además, estas células tienen mayores niveles de receptor NMDA, la que contribuye con la mayor plasticidad de las nuevas GC (Ge *et al.*, 2007; Snyder *et al.*, 2001).

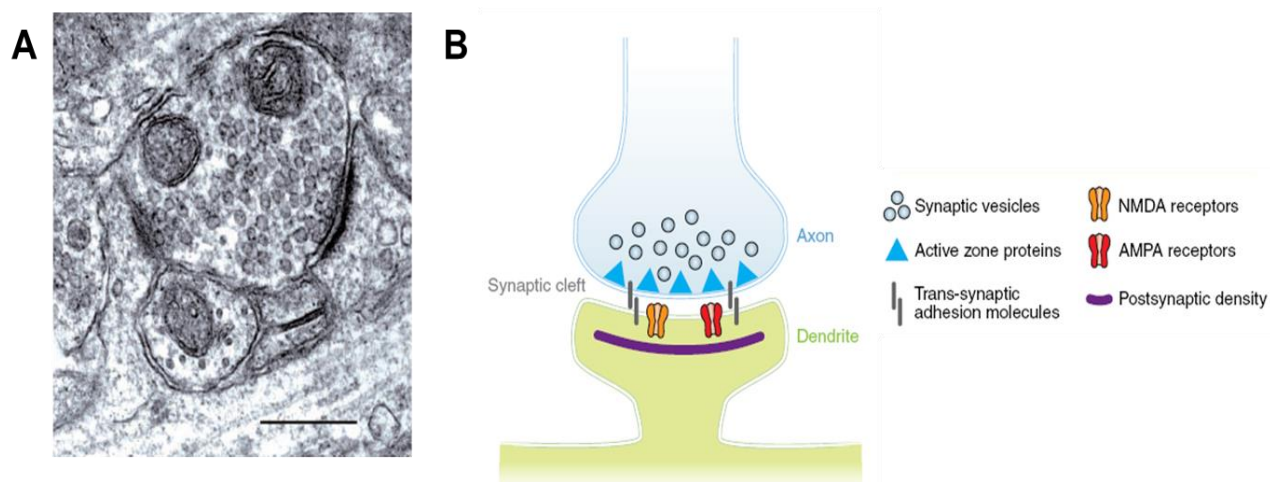


Figura 3. Estructura de espinas dendríticas. Imágenes de espinas dendríticas en microscopia electrónica y esquema donde se observan sus componentes básicos. **A.** Terminal pre-sináptico formando una sinapsis glutamatérgica con dos espinas dendríticas. Se observan vesículas sinápticas que contienen agrupaciones de glutamato en el sitio del contacto sináptico (adaptado de Kennedy, 2000). **B.** Representación esquemática de la sinapsis glutamatérgica. Se observan los receptores NMDA y AMPA que se encuentran en la membrana post-sináptica asociados a proteínas de andamiaje como PSD-95 (McAllister, 2007).

Durante la integración al circuito hipocampal, las nuevas GC primero son activadas tónicamente por la liberación de GABA al ambiente por parte de los astrocitos (Ge *et al.*, 2006), y luego se generan *inputs* sinápticos GABAérgicos (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006), los que inicialmente inducen depolarización debido a que la concentración de cloruro es inversa a la de las neuronas maduras (Ge *et al.*, 2006). Posteriormente hay una variación en el umbral donde se cambian las concentraciones de cloruro y GABA comienza a ser hiperpolarizante. Finalmente, se forman los *inputs* sinápticos glutamatérgicos (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006; Ming and Song, 2011) (Figura 4).

En la neurogénesis hipocampal adulta existen dos periodos críticos de sobrevivencia. Uno de ellos ocurre en la etapa de diferenciación (Sierra *et al.*, 2010); el segundo ocurre en la etapa de integración de las neuronas inmaduras (Tashiro *et al.*, 2006). La sobrevivencia de las nuevas GC en este segundo periodo crítico es dependiente de los receptores NMDAR y por lo tanto, de la formación de los *inputs* glutamatérgicos (Tashiro *et al.*, 2006).

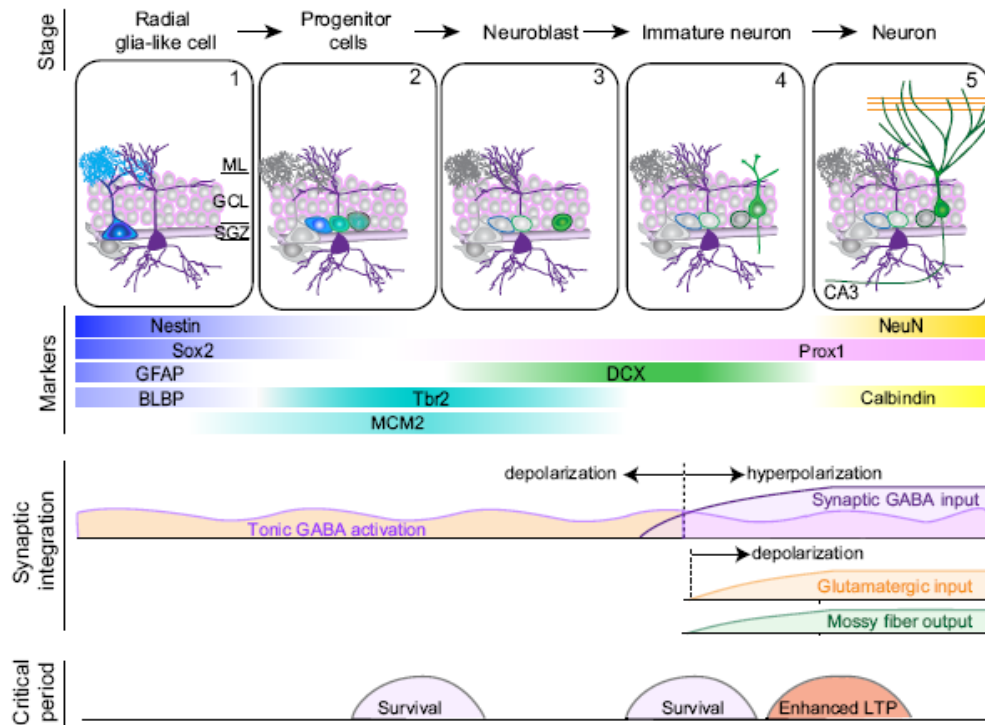


Figura 4. Proceso secuencial de la integración sináptica. Representación donde se observan las etapas de desarrollo de la neurogénesis hipocampal adulta, los marcadores moleculares presentes en cada una de estas etapas, los procesos secuenciales de la integración sináptica y los periodos críticos que se encuentran durante la regulación de la plasticidad (Ming and Song, 2011).

3.3 Funciones de PSD-95 en sinapsis glutamatérgica y plasticidad hipocampal

En la PSD hay múltiples familias de proteínas de andamiaje que tienen la función de anclar los receptores de neurotransmisores específicos como NMDA y AMPA (Keith and El-Husseini, 2008), moléculas de señalización celular (Zheng *et al.*, 2011) y moléculas de adhesión (Kim and Sheng, 2004). Dentro de estas moléculas de andamiaje que se localizan en la PSD de la sinapsis glutamatérgica se encuentran los miembros de la familia de las guanilato kinasas asociadas a membrana (MAGUK) SAP102, SAP97, PSD-93, PSD-95.

PSD-95, la proteína más abundante en la PSD de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas (Sans *et al.*, 2000; Al-Hallaq, 2007; Petralia *et al.*, 2005), contienen tres dominios PDZ, un dominio Src-homology-3 (SH3) o motivo WW (dos residuos de triptófano conservados) y una región homologa de guanilato quinasa de levadura (región

GK) (Figura 5) (Keith and El-Husseini, 2008). Además de su papel estructural en las sinapsis, PSD-95 juega una función importante en la regulación de la actividad y la señalización de los NMDAR y AMPAR (Schnell *et al.*, 2002; Keith and El-Husseini, 2008).

En cuanto a las proteínas de andamio de la PSD que están interactuando con estos receptores, los NMDAR que son abundantes en subunidades NR2A están unidos a PSD-95 en las sinapsis maduras, mientras que los NMDAR abundantes en subunidades NR2B están unidos a SAP102 localizadas en los espacios extra o peri-sinápticos de las sinapsis inmaduras (van Zundert *et al.*, 2004; Al-Hallaq *et al.*, 2007). De acuerdo a esto, existe un incremento de la actividad neuronal durante el desarrollo, la translocación y expresión de PSD-95 aumenta, lo que permite el movimiento de los receptores NR2A-NMDA a la densidad post-sináptica en la cual se insertan y desplazan el complejo formado por la proteína de andamiaje SAP102 y el receptor NR2B-NMDA, limitando la plasticidad (van Zundert *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2014).

Durante el desarrollo neuronal se produce un cambio en las subunidades del NMDAR (NR2A y NR2B) con distintas proteínas de anclaje (van Zundert *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2014), donde hay cambios entre el receptor NR2B-NMDA hacia el receptor NR2A-NMDA, produciéndose una disminución en la plasticidad del cerebro (van Zundert *et al.*, 2004). Dichos cambios en la composición de receptores NMDA presentes en la región post-sináptica, se presentan específicamente en las neuronas inmaduras que están enriquecidas en NR2B, mientras que las neuronas maduras están enriquecidas en NR2A. El complejo NR2B-NMDAR permite una reorganización estructural de las conexiones neurales, es decir una mayor plasticidad, mientras que NR2A-NMDAR está involucrado en la estabilidad neuronal, es decir menor plasticidad (Cull-Candy *et al.*, 2001; van Zundert *et al.*, 2004).

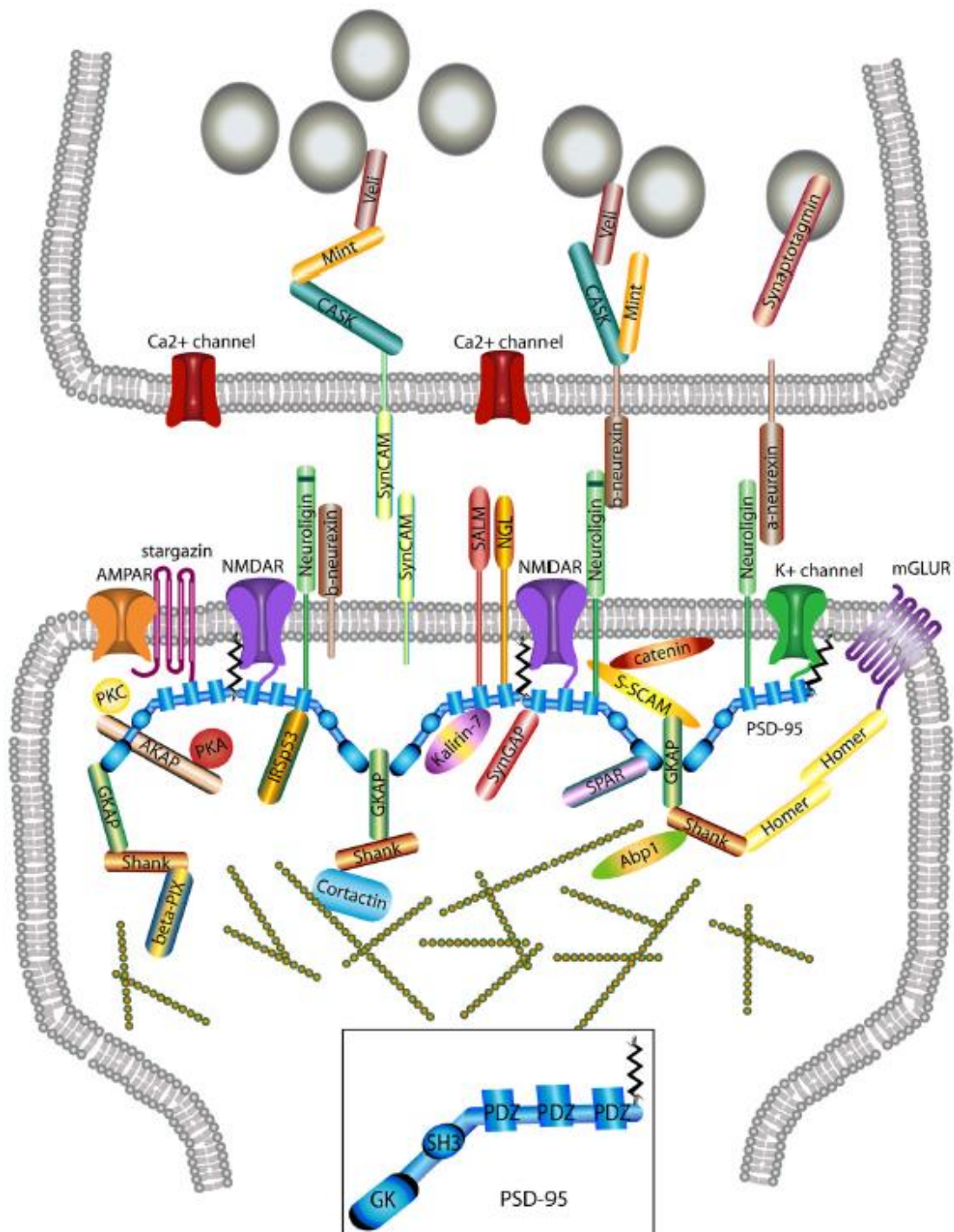


Figura 5. Complejo macromolecular de la densidad post-sináptica. Organización molecular de la sinapsis glutamatérgica. Se muestran solo las moléculas asociadas a PSD-95. Varias moléculas que regulan la función sináptica, la morfología, el tráfico y la localización de moléculas de adhesión y receptores de neurotransmisores (Keith and El-Husseini, 2008).

Por otra parte, se ha establecido que existe una directa relación entre PSD-95 y el control sináptico del número AMPAR, por medio de una proteína asociada a este receptor conocida como stargazin (Schnell *et al.*, 2002), donde un incremento de PSD-95 permite el reclutamiento de nuevos AMPAR a la sinapsis sin necesidad de alterar el número de los receptores ya existentes, también al sobre expresar stargazin hay un incremento de AMPAR extra-sinápticos lo que permite el favorecimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) (Schnell *et al.*, 2002), mecanismo del cual se cree que nace la memoria y el aprendizaje.

En el hipocampo, PSD-95 juega un rol importante modulando la maduración de la sinapsis glutamatérgica mediante el aumento de los AMPAR y NMDA (El-Husseini *et al.*, 2000; Gerrow *et al.*, 2006; Losi *et al.*, 2003), como también un incremento en el número y tamaño de las espinas dendríticas, lo que demostraría que PSD-95 participa en el desarrollo sináptico, estabilización de la sinapsis y plasticidad hipocampal (El-Husseini *et al.*, 2000). La sobreexpresión de esta proteína causa una disminución del árbol dendrítico de neuronas hipocampales lo que estaría asociado a una disminución de la plasticidad por aumento de los receptores NR2A, la que se podría revertir mediante la disminución de la expresión de PSD-95, que conlleva a un aumento en la complejidad dendrítica, estabilización de estos procesos e inducción del LTP (Keith and El-Husseini, 2008; Bustos *et al.*, 2014). Por consiguiente, en el hipocampo existe una relación entre PSD-95 y el desarrollo estructural y sináptico en las neuronas.

Debido a que: (i) la integración sináptica de las nuevas GC en el hipocampo adulto juega un papel fundamental en la sobrevivencia de dichas neuronas, (ii) PSD-95 juega un papel crucial para la sinapsis glutamatérgica y en el desarrollo de las neuronas hipocampales, favoreciendo la maduración de la sinapsis y disminución de la plasticidad estructural, (iii) la neurogénesis adulta recapitula la neurogénesis embrionaria en muchos aspectos, sugerimos que PSD-95 juega un papel similar durante el desarrollo y maduración de las nuevas neuronas en el hipocampo adulto.

4. HIPÓTESIS

PSD-95 regula el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo de ratón adulto.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vivo* el papel de PSD-95 en el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas en las nuevas neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Silenciar PSD-95 en células de ratón utilizando un shRNA.
2. Evaluar *in vivo* la función de PSD-95 sobre el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas de las nuevas neuronas utilizando un shRNA contra PSD-95.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Objetivo específico 1: Silenciar PSD-95 en células de ratón utilizando un shRNA.

Utilizando vectores de silenciamiento (shRNA) se busca silenciar la expresión de la PSD-95. Para validar los cambios de expresión de dicha proteína se buscó células de ratón que expresen PSD-95. Utilizamos cultivo primario de progenitores hipocampales adultos (AHPs) y la línea celular Neuro-2a (neuroblastoma). En base a los resultados obtenidos optamos por las células N2a que expresan la proteína de interés y su mantenimiento y crecimiento es menos complejo que los AHPs cuya tasa de proliferaciones es más baja.

Posteriormente, se generaron y concentraron partículas retrovirales mediante ultracentrifugación con la utilización de los vectores pSIREN (shC y shPSD95) los que se utilizan para infectar células N2a con la finalidad de ver el efecto generado por el knockdown de PSD-95 mediante qRT-PCR y western blot, con lo que finalmente se procedió a la utilización de animales para realizar experimentos *in vivo*.

Objetivo específico 2: Evaluar *in vivo* la función de PSD-95 sobre el desarrollo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas de las nuevas neuronas utilizando un shRNA contra PSD-95.

Luego de obtenidos los retrovirus shC y shPSD95 y comprobada la disminución de la expresión de PSD-95, dichos retrovirus se inyectan en el giro dentado del hipocampo de ratones de 2 meses mediante cirugía estereotáxica. Los animales utilizados se mantuvieron en el bioterio por 2, 4 y 6 semanas post-inyección (wpi) dependiendo de los análisis que se realizaron. La estrategia a seguir se muestra en la figura 6.

A las 2 wpi se analizó la morfología dendrítica de las nuevas neuronas infectadas con los retrovirus que también expresaron el marcador de neurona inmadura DCX, es decir se analizaron las células ZsG+/DCX+. Se realizó el análisis de diferenciación neuronal, donde se contabilizaron las células infectadas, tomando en cuenta todas las células ZsG+

como el total de la población infectada. Además, se analizó la migración de las células infectadas a través de la capa de células granulares (GCL) y el largo total dendrítico de células infectadas en ambas condiciones.

A las 4 wpi se analizó la complejidad dendrítica de las nuevas neuronas granulares infectadas con los retrovirus que también expresaron el marcador de neurona madura NeuN (ZsG+/NeuN+). Los análisis que se realizaron son de migración de las células infectadas a través de la capa de células granulares (GCL); el largo total dendrítico de células infectadas en ambas condiciones; el número de intersecciones dendríticas; número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternaria; y el análisis de Sholl donde se determinó la cantidad de intersecciones encontradas en círculos concéntricos de 10 μm de distancia contando a partir del soma.

A las 6 wpi se analizó la formación de espinas dendríticas de las nuevas neuronas granulares infectadas con los retrovirus (ZsG+) las que también expresaron el marcador de neurona madura NeuN (ZsG+/NeuN+). Se adquirieron imágenes de fragmentos de dendritas con espinas dendríticas y se realizaron proyecciones de máxima intensidad (z-stacks).

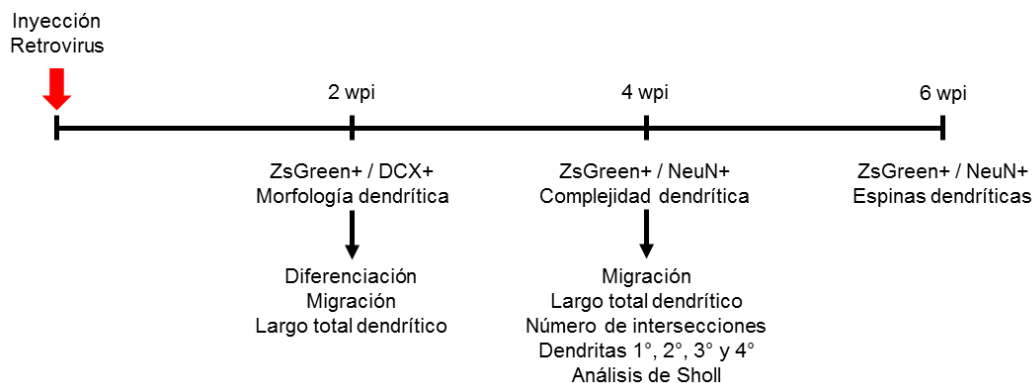


Figura 6. Representación esquemática del procedimiento experimental. Retrovirus shC y shPSD95 se inyectan en el giro dentado de animales de 2 meses de edad mediante cirugía estereotóxica y son sacrificados 2, 4 o 6 wpi.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 2 meses de edad, con pesos entre los 20 y 25 gramos. Fueron criados y mantenidos en un bioterio con las normas de seguridad requeridas. Dichos animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, además se mantuvieron en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a temperatura ambiente. Para la realización de los experimentos, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de la solución de 100 mg/mL ketamina (Richmond, Vet Pharma, Argentina) y 10 mg/Kg xilacina (Centrovét, Chile), suero 9% y agua nanopure, inyectando 5 µL/gramo a cada animal. En la tabla 1 se muestran los volúmenes de anestesia utilizados para procedimientos experimentales como cirugía donde se usa la dosis media, y para perfusión transcardiaca donde se usa la dosis alta.

Tabla 1. Dosis de anestesia utilizada en animales para procedimientos experimentales y sacrificio

	Dosis media	Dosis alta
Ketamina 10%	1,5 µL	2 µL
Xilacina 2%	0,75 µL	1 µL
NaCl 9%	0,5 µL	0,5 µL
Agua nanopure	2,25 µL	1,5 µL

7.2 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular Neuro-2a (N2a, neuroblastoma de ratón; ATCC, USA), las cuales se mantuvieron en medio EMEM (Lonza BioWhittaker) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS; GIBCO, USA), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina (Pen/Strep; GIBCO, USA) y 1X aminoácidos no esenciales (MEM NEAA; GIBCO, USA). Además, se utilizó la línea celular Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T; Clontech, USA), las cuales se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa (GIBCO, USA) suplementado

con 10% suero fetal bovino (FBS; GIBCO, USA), 1X antibiótico penicilina/estreptomicina (Pen/Strep; GIBCO, USA) y 1X aminoácidos no esenciales (MEM NEAA; GIBCO, USA). Ambas líneas celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ para su mantención.

7.3 Purificación de vectores retrovirales

Los vectores que se utilizaron en la presente tesis fueron: pBABE-GFP, pBABE-PSD95-GFP, pMKO-GFP, pMKO-shPSD95-GFP, pCMV-Gag-Pol, pCMV-VSV-G y pSIREN-RetroQ-ZsGreen1. El vector pCMV-Gag-Pol es un vector que expresa las proteínas para el retrovirus bajo el promotor fuerte CMV (promotor Cytomegalovirus), lo cual le permite manejar la transcripción del genoma viral modificado que está basado en el Virus de Leucemia Murina Moloney (MoMLV). La región Gag de este vector codifica los genes de las proteínas de la cápside, mientras que la región Pol codifica las proteínas de transcriptasa reversa e integrasa.

El vector pCMV-VSV-G es un vector de envoltura, es decir es una glicoproteína de envoltura de Rhabdovirus Vesicular Stomatitis, el cual contiene una región VSV-G que interactúa con los componentes de fosfolípidos de la membrana de la célula diana y permite la fusión de las membranas virales y celulares; esta región no requiere de un receptor de superficie celular, por lo tanto tiene la función de reemplazar las proteínas de envoltura de otros virus de forma de aumentar el rango del hospedero.

El vector retroviral con la secuencia de interés que se utilizó fue RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 (figura 7A, Clontech). El inserto diseñado para silenciar la expresión de PSD-95 presenta una secuencia shRNA que hibrida mediante apareamiento de bases con el mRNA de PSD-95 (figura 7B). El vector además contiene un gen que codifica para la proteína fluorescente verde ZsGreen que permite visualizar las células que expresan el shRNA.

Para la purificación de dicho vector, primero se transformaron bacterias *E. coli* Stbl3 competentes con 100-200 ng de DNA plasmidial mediante shock térmico sometiendo las bacterias a distintas temperaturas (4°C por 2 min, 37°C por 1 h y 42°C por 45 seg). La

selección se realizó en medio con Ampicilina (100 µg/mL). Se realizó la extracción de DNA a través del método de lisis y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas MluI (10.000 U/mL; New England BioLabs) y AgeI (5.000 U/mL; New England BioLabs). Posteriormente, con las colonias seleccionadas, se realizó una extracción de DNA a gran escala de acuerdo al protocolo entregado por el fabricante del kit utilizado (Macherey Nagel).

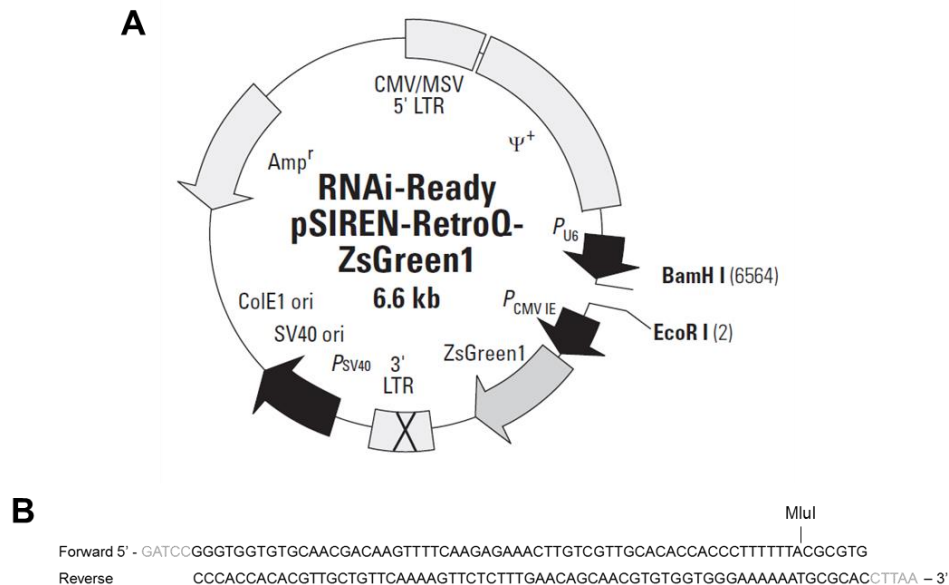


Figura 7. Vector de silenciamiento retroviral. A. Esquema del vector retroviral (Clontech). Se observan los sitios de restricción y de clonamiento BamHI y EcoRI, donde se ligaron los oligos alineados del shRNA contra PSD-95. **B.** Secuencia del shRNA contra PSD-95.

7.4 Extracción de RNA y transcripción reversa

Se extrajo RNA total a partir de células N2a utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la utilización del TRIzol (Invitrogen, USA), la placa se lavó con 1 mL de PBS 1X para luego añadir 1 mL de dicho reactivo y traspasar el homogeneizado a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se incubó el homogeneizado por 5 min a temperatura ambiente y luego se adicionó 200 µL de cloroformo (Winkler, Chile) y se agitó vigorosamente por 15 seg, se incubó nuevamente 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó el homogeneizado a 12.000 g por 15 min a 4°C

permitiendo que se formaran 3 fases, donde la fase acuosa superior se removió y se traspasó a un tubo nuevo. Luego, se adicionaron 500 μ L de isopropanol 100% (Winkler, Chile) hasta homogeneizar la solución y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante dejando solo el pellet, el cual se lavó con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet obtenido por 10 min a temperatura ambiente y se procedió a resuspenderlo con 22 μ L de agua sin nucleasas estéril. Finalmente, el RNA fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 2 μ g de RNA, al cual se le añadió 0,5 μ L de oligo-dT (Invitrogen, USA) y se llevó a un volumen final de 10 μ L con agua sin nucleasas estéril. Luego, se incubó por 5 min a 72°C en el termociclador. Mientras transcurrió dicho tiempo, se preparó un nuevo tubo de 0,2 mL con 2 μ L de buffer RT-M-MuLV (New England BioLabs, UK), 0,5 μ L de inhibidor de RNasa (New England BioLabs, UK), 0,5 μ L de dNTPs (Thermo Scientific, USA), 0,5 μ L de enzima RT-M-MuLV (New England BioLabs, UK) y 6,5 μ L de agua sin nucleasas estéril. Ambos tubos se mezclaron obteniéndose un volumen final de 20 μ L. Posteriormente, se incubó la reacción en el termociclador por 1 h a 42°C, 10 min a 90°C y 10 min a 4°C. Finalmente, se añadieron 80 μ L de agua sin nucleasas estéril y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.5 qRT-PCR

Para la realización del qRT-PCR, se utilizaron 500 nM de los partidores GAPDH y 2 μ L de cDNA, 300 nM de los partidores PSD-95 y 1 μ L de cDNA (Tabla 2). Dichos partidores se utilizaron en las concentraciones mencionadas añadiendo el mix 2X SYBR Green (Agilent Technologies, USA) a cada tubo, obteniéndose un volumen final de 20 μ L. Las condiciones para el qRT-PCR fueron: 1 seg a 25°C, 10 min a 95°C, 15 seg a 95°C por 40 ciclos, 15 seg a 60°C por 40 ciclos, 15 seg a 72°C por 40 ciclos, 15 seg a 95°C, 1 seg a 25°C, 15 seg a 70°C y 1 min a 95°C.

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para el estudio de expresión génica

Partidor	Secuencia
GAPDH Forward	5' - CATGGCTTCCGTGTTTCCTA - 3'
GAPDH Reverse	5' - CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT - 3'
PSD-95 Forward	5' - GCCCTGTTTGACTACGACAA - 3'
PSD-95 Reverse	5' - CTCATAGCTCAGAACCGAGT - 3'

7.6 Western blot

Para la detección de PSD-95 mediante western blot se utilizaron células N2a. Las células fueron lavadas con PBS 1X frío para luego ser lisadas con un mix de buffer RIPA (Thermo Scientific, USA) más inhibidores de fosfatasa y de proteasas. Posteriormente, se traspasó el lisado a tubos eppendorf de 1,5 mL los cuales se mantuvieron en hielo por 30 min; durante este tiempo se disgregaron las células mediante la utilización de una jeringa, pasando por ella el volumen obtenido entre 10 y 15 veces. Luego se centrifugaron las células a 1.000 g por 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización para cuantificar la concentración de proteínas mediante el kit de cuantificación por BCA (Thermo Scientific, USA). Luego de la cuantificación y determinación de los microgramos de proteínas a utilizar, estas se resolvieron en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% para posteriormente ser transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 400 mA por 2 h, la cual fue previamente activada con metanol 100% (Winkler, Chile) y se seca hasta su utilización.

Para la identificación de proteínas con anticuerpos, la membrana se reactiva con metanol 100% (Winkler, Chile) por 5 min, se lava el exceso de metanol con agua y se le agrega Rojo Ponceau para observar si la carga y transferencia de proteínas fue la correcta, se lava el exceso de tinción y luego se bloquea la membrana con solución de bloqueo que contiene PBS 1X-Tween20 (Winkler, USA) al 0,05% más 5% de leche por 1 h. Posterior al bloqueo, se prepararon los anticuerpos primarios PSD-95 (1:10000, mouse; Neuromab) y α -Tubulina (1:1000, mouse; Millipore) en solución de bloqueo y se incubó

la membrana toda la noche (O/N) a 4°C y en agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0,05% por 10 min en agitación, para luego incubarla con anticuerpo secundario (1:3500) preparado en la solución PBS 1X-Tween20 (Winkler, USA) al 0,05% más 5% de leche a temperatura ambiente por 2 h en agitación. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0,05% por 5 min en agitación y se mantuvo en PBS 1X hasta ser revelada mediante quimioluminiscencia.

7.7 Transfección de células N2a con Lipofectamina 3000

Para transfectar células N2a se sembraron 160.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos con el fin de realizar la transfección al día siguiente. Se utilizaron 7,5 µL de Lipofectamina 3000 (Invitrogen, USA), 2,5 µg de DNA (vector con shRNA), 5 µL de P3000 (Invitrogen, USA) y 250 µL de OptiMEM (GIBCO, USA). Se incubó el mix 5 min a temperatura ambiente y se agregó directamente al pocillo con células las cuales permanecieron en medio de proliferación EMEM (Lonza, USA). Cabe destacar que los volúmenes de los reactivos mencionados anteriormente son para solo un pocillo de una placa de 6 pocillos. Luego de 48 h las células fueron lisadas para la realización de los experimentos posteriores como qRT-PCR y/o western blot.

7.8 Transfección de células HEK293T y concentración de retrovirus

Se sembraron entre 20 y 24 placas de 100 mm con $1 \cdot 10^6$ células HEK293T (Clontech, USA) cada una, las cuales se mantuvieron en 8 mL de medio DMEM alta glucosa (GIBCO, USA) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS; GIBCO, USA), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin (Pen/Strep; GIBCO, USA) y 1% aminoácidos no esenciales (MEM NEAA; GIBCO, USA) a 37°C con 5% de CO₂. Luego de dos días y esperando que las células alcanzaran una confluencia de 80-90%, se transfectaron con Polietilenimina (PEI Max), donde se utilizaron los reactivos y volúmenes presentados en la tabla 4, tubos los cuales se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y luego se mezclaron para incubarse nuevamente 10 min a temperatura ambiente. Posterior a

ambas incubaciones, se agregaron los 200 μ L totales a una placa con células HEK293T, las que previamente fueron lavadas con PBS 1X y mantenidas en 7 mL medio OptiMEM (GIBCO, USA). Al día siguiente a la transfección, se reemplazó el medio por 7 mL de medio OptiMEM (GIBCO, USA) fresco y se mantuvieron por 48 h adicionales.

Tabla 4. Volúmenes de reactivos para transfección con Polietilenimina de células HEK293T

	DNA	PEI	Glucosa 5%
Tubo 1	-	48 μ L	52 μ L
Tubo 2	21 μ g (36 μ L)	-	64 μ L

* Los 21 μ g de DNA que contiene el tubo 2 corresponde a 12 μ g de shRNA (vector de interés, 6 μ g de CMV y 3 μ g de VSV-G.

** Los volúmenes de los reactivos mencionados corresponden a los volúmenes utilizados en una placa de 100 mm.

Transcurridas las 96 h requeridas luego de la transfección, se concentró el retrovirus mediante ultracentrifugación. Se recolectó el medio de cultivo en el cual se mantenían las células en tubos falcon de 50 mL y se centrifugó a 2000 rpm por 3 min a 4°C con el fin de remover los restos celulares, luego se filtró el sobrenadante en filtros desechables de 0,45 μ m y se traspasó el volumen a tubos de ultracentrífuga de 36 mL. Se ultracentrifugó el volumen obtenido a 19.000 rpm (65.000 g) por 2 h a 4°C con rotor AH-629, para posteriormente extraer el sobrenadante y lavar el pellet con 900 μ L de PBS 1X frío y 250 μ L de sacarosa 20%. Se ultracentrifugó nuevamente a 21.000 rpm (65.000 g) por 2 h a 4°C con rotor TH-660, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 70-80 μ L de PBS 1X frío estéril toda la noche (O/N) a 4°C en agitación. Al día siguiente, se alicuotó el virus y se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

7.9 Título viral

Para determinar el título del retrovirus concentrado por ultracentrifugación, se sembraron células HEK293T en una placa de 24 pocillos (40.000 células/pocillo). Cuando llegaron

una confluencia de 70-80% se infectaron con el virus. Se realizaron diluciones seriadas de virus en PBS 1X (10^{-2} a 10^{-6}), de forma que al primer pocillo se le agregó 1 μ L directo, mientras que a los pocillos restantes se les agregaron 10 μ L de las diluciones seriadas realizadas. Transcurridas 48 h de infección se procedió a contar el título viral el cual corresponde al conteo de grupos de células ZsGreen+. Utilizando la ecuación se determinó el título viral.

Fórmula 1. Fórmula para calcular el título viral de un virus concentrado

$$\text{Título viral (unidades formadoras de colonias}/\mu\text{L}) = \frac{\text{Número de colonias fluorescentes}}{(\text{Dilución} \bullet 10 \mu\text{L})}$$

7.10 Cirugía estereotáctica

Las partículas retrovirales generadas mediante la metodología antes descrita, se inyectaron a través de cirugía estereotáctica en el giro dentado del hipocampo siguiendo el protocolo publicado previamente por Tashiro *et al.* (2006).

Siguiendo el protocolo de supervisión, se determinó que los animales estaban en buenas condiciones para ser sometidos a cirugía estereotáctica. Los ratones elegidos para llevar a cabo este procedimiento fueron previamente anestesiados con una dosis media de anestesia (tabla 1), se mantuvieron 10 min bajo una fuente de calor suave hasta que estuvieran completamente dormidos y se realizó un corte vertical sobre el cráneo del animal, para luego posicionarlo en el estereotático de forma de ubicar Bregma. Luego de ubicado Bregma, se calcularon las coordenadas descritas por Tashiro *et al.* (2006) para realizar la inyección del virus en el giro dentado del hipocampo: -2 mm anteroposterior, $\pm 1,5$ mm lateral y -2,3 mm profundidad. Cuando se determinó el punto correcto de las coordenadas, se perforó el cráneo y se inyectaron 1,5 μ L de virus en un hemisferio cerebral. La inyección del virus se demoró 3 min, puesto que se realiza a una velocidad de 0,5 μ L/min, luego de depositar el virus se esperó 1 min y se subió la jeringa 1 mm y se repitió la espera de 1 min, para luego retirar la aguja completamente. Al finalizar la inyección, se retira al animal del estereotático, se sutura la herida y se mantiene al animal

bajo una fuente de calor suave hasta que despierte. Previo a que despierte, se inyectó 10 µL/gramo de una solución de Naxpet (1:200; Drag Pharma, Chile) diluido en NaCl 0,9%. Los días posteriores a la cirugía se realizó control de peso tres veces por semana a cada animal, según el protocolo de supervisión de animales aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello.

7.11 Perfusión transcardial y obtención de cortes coronales de cerebros

Los animales sometidos a cirugía estereotáxica fueron sacrificados mediante una perfusión transcardial luego de 1, 2, 4 y 6 semanas post-inyección (wpi). Primero, los animales fueron pesados y luego anestesiados con una dosis alta de anestesia con los volúmenes que se muestran en la tabla 1, estos se mantuvieron 10 min bajo una fuente de calor suave hasta que estuvieran completamente dormidos para luego proceder a la perfusión, que consistió en limpiar los capilares sanguíneos con NaCl 0,9% (50 mL por ratón) y luego paraformaldehído 4% (PFA 4%) disuelto en buffer fosfato pH 7,4 (50 mL por ratón). Finalmente, se extrajo el cerebro, el que se sumergió en PFA 4% durante 24 h a temperatura ambiente y luego se traspasó a una solución de sacarosa 30% en PBS. Dichos cerebros luego se cortaron en un criostato y las secciones coronales obtenidas de 50 µm de espesor se guardaron en 12 pocillos de placas de 24 pocillos con PBS frío. Cada uno de estos pocillos contiene 5 a 7 secciones de cerebro que cubren la longitud total del hipocampo. Finalmente, los tejidos se almacenaron a -20°C en solución OLMOS hasta su posterior análisis.

7.12 Inmunofluorescencia de tejidos

Para determinar la presencia de distintos marcadores moleculares en las neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo, se utilizaron ratones adultos de los cuales se obtuvieron cortes coronales de cerebro, los cuales se seleccionaron y fueron transferidos a una placa de 48 pocillos y se lavaron tres veces por 5 min con PBS. Luego, se bloquearon los tejidos con buffer que contiene PBS 1X-TritónX 100 (Sigma, USA) al

0,5%, 3% Albúmina de Suero Bovino (BSA; Winkler, Chile) y 3% Donkey Serum (Sigma, USA) por 4 h, para posteriormente preparar los anticuerpos primarios (tabla 5) a utilizar en esta misma solución e incubarlo toda la noche (O/N) a 4°C en oscuridad y agitación. Al día siguiente, los tejidos se lavaron tres veces con PBS 1X-TritónX 100 0,5% por 5 min en agitación, para luego incubarlos con anticuerpo secundario (1:500) preparado en buffer secundario que contiene PBS 1X-TritónX 100 (Sigma, USA) al 0,5% y 3% Albúmina de Suero Bovino (BSA; Winkler, Chile) y se incubó a temperatura ambiente por 2 h en agitación. Finalmente, los tejidos se lavaron tres veces PBS 1X-TritonX 100 0,5% por 5 min en agitación y una vez con PBS 1X y se montaron en portaobjetos gelatinizados, a los cuales se les agregó el medio de montaje Fluoromont-G (Electron Microscopy Science). Se dejaron secar en oscuridad por 24 h y se guardaron a 4°C hasta su análisis. Los análisis fueron realizados en microscopio de epifluorescencia o microscopio confocal.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia de tejidos

Anticuerpos primarios	Especie	Dilución	Marca
AntiZsGreen	Rabbit	1:1000	Clontech
AntiDCX	Goat	1:250	Santa Cruz
AntiNeuN	Mouse	1:300	Santa Cruz

7.13 Análisis de las nuevas células infectadas

Para los análisis de 2, 4 y 6 wpi se cuantificaron las células que expresan ZsGreen+ (ZsG+), que indica que fueron infectadas por los retrovirus shC y shPSD95. Para los análisis de 2 wpi se cuantificaron las células ZsG+/DCX+ que se encontraron en la SGZ. Para los análisis de 4 y 6 wpi se cuantificaron las células ZsG+/NeuN+ que se encontraron en la GCL y sólo se utilizaron aquellas células que tuvieran el árbol dendrítico completo para poder realizar los análisis de morfología y Sholl.

7.14 Análisis de migración celular, largo total dendrítico e intersecciones dendríticas

Los análisis morfológicos se realizaron a partir de reconstrucciones de las neuronas mediante la utilización de un microscopio confocal, con el cual se obtuvieron imágenes de todas las neuronas ZsG+ con sus proyecciones completas que se encontraron en las secciones coronales de cerebro de 50 μm . Las imágenes adquiridas se procesaron y analizaron en el programa ImageJ, el cual posee herramientas que permitieron realizar el análisis de migración cuantificando la distancia recorrida por las células infectadas, tomando como punto de inicio (0%) la zona subgranular y como punto de termino la capa molecular (100%); y mediante la utilización del plugin NeuronJ se cuantificó el largo total dendrítico de cada neurona y la cantidad de intersecciones que estas poseen.

7.15 Análisis de Sholl

El análisis de Sholl se realizó mediante la utilización del programa ImageJ y su plugin *Sholl analysis*. Para realizar este análisis, previamente se debieron generar los *tracing* de las neuronas con el plugin NeuronJ, donde se determinó la cantidad de intersecciones encontradas en círculos concéntricos de 10 μm de distancia contando a partir del soma. Los valores obtenidos de cada neurona se promediaron entre sí y se graficaron las intersecciones con respecto a la distancia total según la condición, siendo estas shC y shPSD95.

7.16 Análisis estadístico

Los valores obtenidos presentados en los gráficos de los análisis antes mencionados fueron representados como el valor promedio \pm error estándar de la media. Los datos obtenidos se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 6, el que también se utilizó para el análisis estadístico.

Además, los datos significativos se determinaron mediante la utilización del test de Student's no pareado, en los cuales se consideró significativo a $*p < 0,05$.

Para los experimentos realizados se tomaron en cuenta al menos tres experimentos independientes, de forma de obtener un $n = 3$ por cada experimento ya sea *in vitro* o *in vivo*. El n de los experimentos y el número de neuronas están especificados en la leyenda de cada figura.

8. RESULTADOS

8.1 La proteína de la densidad post-sináptica PSD-95 se expresa en N2a, AHPs e hipocampo de ratón adulto

Lo primero que se realizó con el fin de evaluar la eficiencia de silenciamiento del shRNA previo al estudio de la función de PSD-95 *in vivo*, fue buscar una línea celular que expresara dicha proteína. Para ello, se analizaron los niveles de mRNA y proteína de PSD-95 en la línea celular de ratón Neuro-2a (N2a), como también en cultivo primario de AHPs mediante qRT-PCR y western blot. El extracto de hipocampo de ratón se utilizó como control positivo.

Para el análisis mediante qRT-PCR se utilizaron partidores que hibriden con el transcrito de PSD-95 y de GAPDH utilizado como control. Los productos esperados son 270 pb y 103 pb respectivamente (figura 8A), basado en el producto generado según la base de datos del genoma de *Mus musculus*. Los productos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa y se observó una banda única en cada una de las muestras correspondiendo a los pares de bases esperados, esto demuestra que PSD-95 se expresa en células N2a y AHPs.

Para el análisis mediante western blot se utilizaron los anticuerpos PSD-95 para determinar la proteína de interés, y actina como control de carga (figura 8B). Se observó que la proteína PSD-95 se expresa en las tres muestras analizadas. Tomando en cuenta el control de carga se puede concluir que los niveles de PSD-95 en AHPs son menores que en células N2a y que en el extracto de hipocampo, donde se observa la mayor expresión. La detección de la expresión de PSD-95 en N2a concuerda con lo reportado previamente por Zheng *et al.*, 2012 y Song *et al.*, 2015. El cultivo primario de AHPs se utilizó como control positivo debido a que se expresa en grandes cantidades en esta región del cerebro (Petrália *et al.*, 2005).

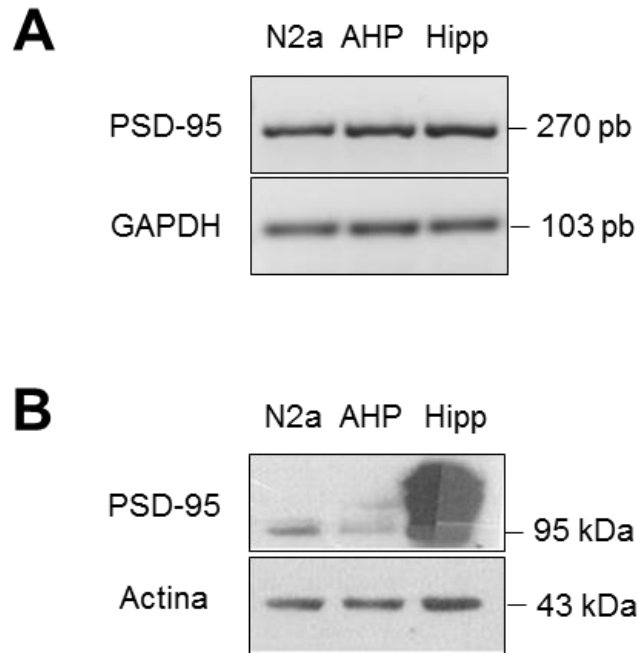


Figura 8. PSD-95 se expresa en la línea celular N2a y AHPs. Se observa la expresión de PSD-95 mediante western blot y RT-PCR. **A.** Electroforesis en gel de agarosa donde se observa la expresión de PSD-95 en N2a, AHPs e hipocampo mediante RT-PCR, utilizando partidores contra PSD-95 y GAPDH. **B.** Western blot utilizando anticuerpos primario contra PSD-95 y Actina. Se observa que PSD-95 se expresa en lisado de proteínas de células N2a y en AHPs, hipocampo (hipp) fue utilizado como control positivo.

8.2 Silenciamiento de PSD-95 en línea celular N2a utilizando un shRNA

Posteriormente, y con el fin de determinar la estrategia para silenciar PSD-95 *in vivo*, se silenció PSD-95 utilizando un vector retroviral que expresa un shRNA contra PSD-95 (shPSD95). Se purificaron los vectores pMKO-GFP y pMKO-shPSD95-GFP que además codifican para la proteína fluorescente verde GFP.

Los vectores se purificaron mediante una extracción de DNA a gran escala según se describe en la sección de materiales y métodos. Posterior a la extracción de DNA se realizó un ensayo de restricción con las enzimas de restricción con la enzima XhoI, esperando obtener un fragmento de DNA de 6.700 pb en el caso del vector pMKO-GFP, mientras que para el vector pMKO-shPSD95-GFP se espera obtener dos fragmentos de DNA correspondientes a 6.300 pb y 400 pb. Los fragmentos de DNA fueron visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 9), obteniéndose como resultado los tamaños (pb) esperados.

Se transfectaron células N2a con los vectores pMKOs con el fin de comprobar el eficiente silenciamiento de PSD-95. A las 48 h post-transfección, se estimó el porcentaje de células GFP+, obteniéndose un 50-60% de eficiencia de transfección (figura 10A) en tres experimentos independientes. Luego, se determinaron los niveles de mRNA a través de qRT-PCR. Las células transfectadas con shPSD95 disminuyen en un 20% los niveles del mRNA de PSD-95 comparado con las células transfectadas con el vector control, utilizando GAPDH como gen endógeno (figura 10B).

Además, utilizando estas mismas células y siguiendo el protocolo de transfección y obteniéndose que el porcentaje de células GFP+ fue entre 50-60% de eficiencia, y mediante western blot se determinó que las células transfectadas con el vector shPSD95 tienen menores niveles de PSD-95 que las células transfectadas con shC (figura 10C). Mediante análisis densitométricos de las bandas obtenidas se determinó que la transfección con pMKO-shPSD95-GFP disminuyó la expresión de PSD-95 en un 50% comparado con las células transfectadas con su vector control (figura 10D).

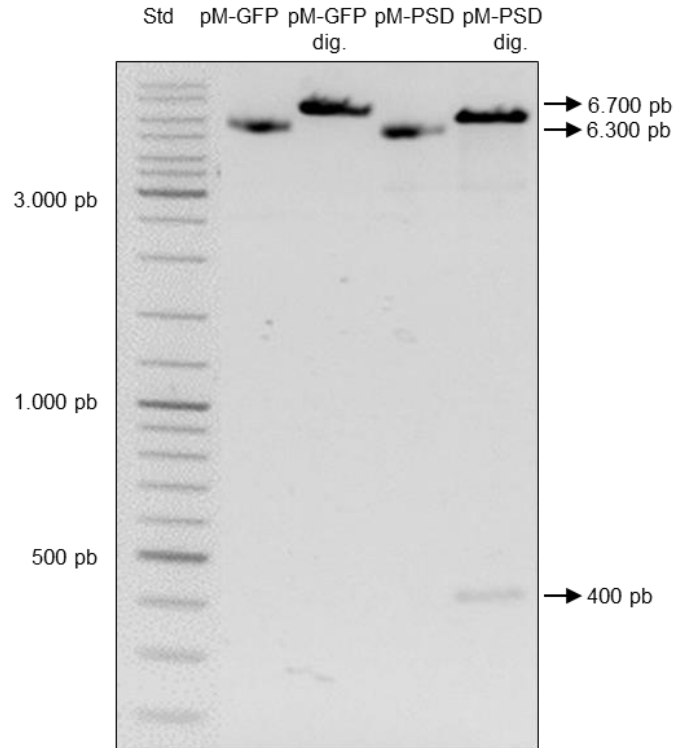


Figura 9. Purificación de vectores pMKO y ensayo de restricción. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observa la correcta extracción y purificación de los vectores pMKO. Gel de agarosa para los vectores pMKO, digeridos con XhoI. En el carril 1 se observa el estándar de peso molecular que fluctúa entre los 10.000 y 100 pb, en el segundo carril se encuentra el vector pMKO-GFP con un peso de 6.700 pb, en el tercer carril se encuentra el vector pMKO-GFP digerido, en el cuarto carril se encuentra el vector pMKO-shPSD95-GFP de aproximadamente 6.700 pb y en el quinto carril se encuentra el vector pMKO-shPSD-GFP digerido, observándose dos bandas de 6.300 pb y 400 pb.

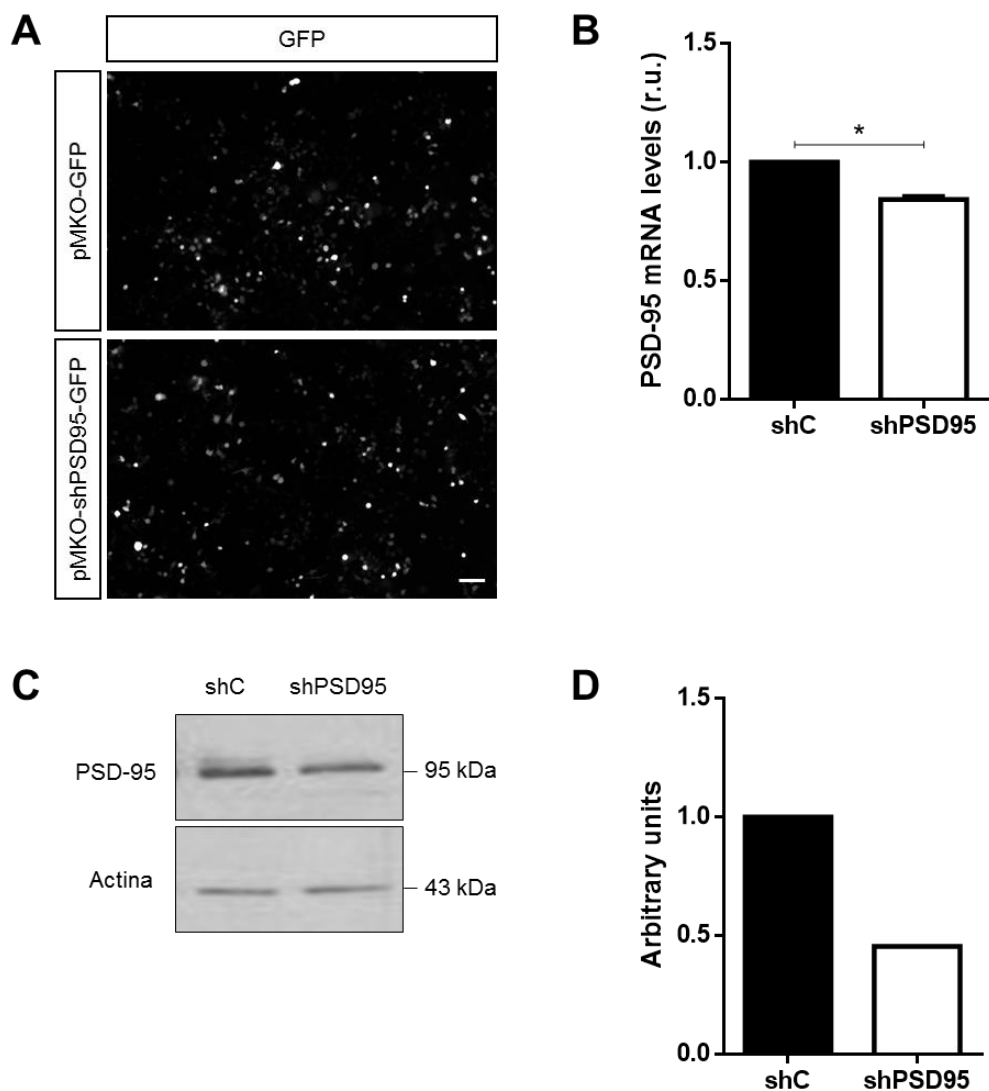


Figura 10. Silenciamiento de la expresión de PSD-95 en células N2a. Se observa la disminución de la expresión de PSD-95 mediante qRT-PCR y western blot. **A.** Imágenes representativas de porcentaje de eficiencia de transfección. Barra de tamaño: 10 μ m. **B.** Análisis de qRT-PCR donde se cuantifica la disminución de la expresión de PSD-95 en células N2a transfectadas con el vector control pMKO-GFP y el vector de silenciamiento pMKO-shPSD95-GFP. Las barras representan el promedio \pm S.E. * $p < 0.05$, Student's t-test (N=3). **C y D.** Western blot de lisado de proteínas de células N2a transfectadas con los vectores antes mencionados donde se observa la banda correspondiente a PSD-95 y la disminución de expresión (C). Cuantificación de unidades relativas para determinar la disminución de la expresión de PSD-95 correspondiente al western blot (N=1) (D).

8.3 Concentración de retrovirus pMKO e inyección en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto

Habiendo comprobado el silenciamiento de PSD95, se procedió con la generación y concentración de retrovirus, con el fin de determinar el efecto *in vivo* que tiene disminuir la expresión de PSD-95, inyectando el retrovirus en el hipocampo de ratones adultos.

Utilizando las células HEK293T empaquetadoras de virus y siguiendo el protocolo de transfección de células con PEI Max, estas células se transfectaron con los vectores pMKO-GFP y pMKO-shPSD95-GFP más vectores CMV (gag-pol) y VSV-G. Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia previo a la concentración del retrovirus por ultracentrifugación, estimándose que el porcentaje de células GFP+ es de un 70-80% en control y en shPSD95 (figura 11A). Luego de la concentración y posterior resuspensión, se determinó el título viral de los retrovirus mediante el protocolo y la fórmula 1. Se observó el pocillo con células infectadas con 1 μ L de retrovirus control y shPSD95 para demostrar la eficiencia de infección de los retrovirus concentrados (figura 11B). Se analizó el título viral y se estimó un título de 10^2 unidades formadoras de colonias/ μ L.

A pesar del bajo título viral y considerando que se analizan las células GFP+, se inyectaron los retrovirus pMKO-GFP (control) y pMKO-shPSD95-GFP en el hipocampo de ratones de 2 meses de edad mediante cirugía estereotáxica, los cuales se sacrificaron a 1 wpi y a 3 wpi, con el fin de determinar si los retrovirus infectaban células *in vivo* y poder realizar análisis de diferenciación neuronal. Transcurridas dichas semanas se sacrificaron a los animales utilizados y se realizaron cortes de los cerebros de manera coronal. Se observaron los cortes de cerebro en el microscopio de epifluorescencia, pero no se observó infección de células (figura 11C). Este experimento, incluida la concentración de un nuevo virus, se repitió tres veces sin resultados positivos.

Es por esta razón que decidí utilizar nuevos vectores retrovirales (pSIREN) que estaban probados previamente en el laboratorio (Mardones *et al.*, 2016), en el cual se realizó el subclonamiento del shRNA (realizado por el Dr. Fernando Bustos, McGovern Institute for Brain Research at MIT, Cambridge, USA).

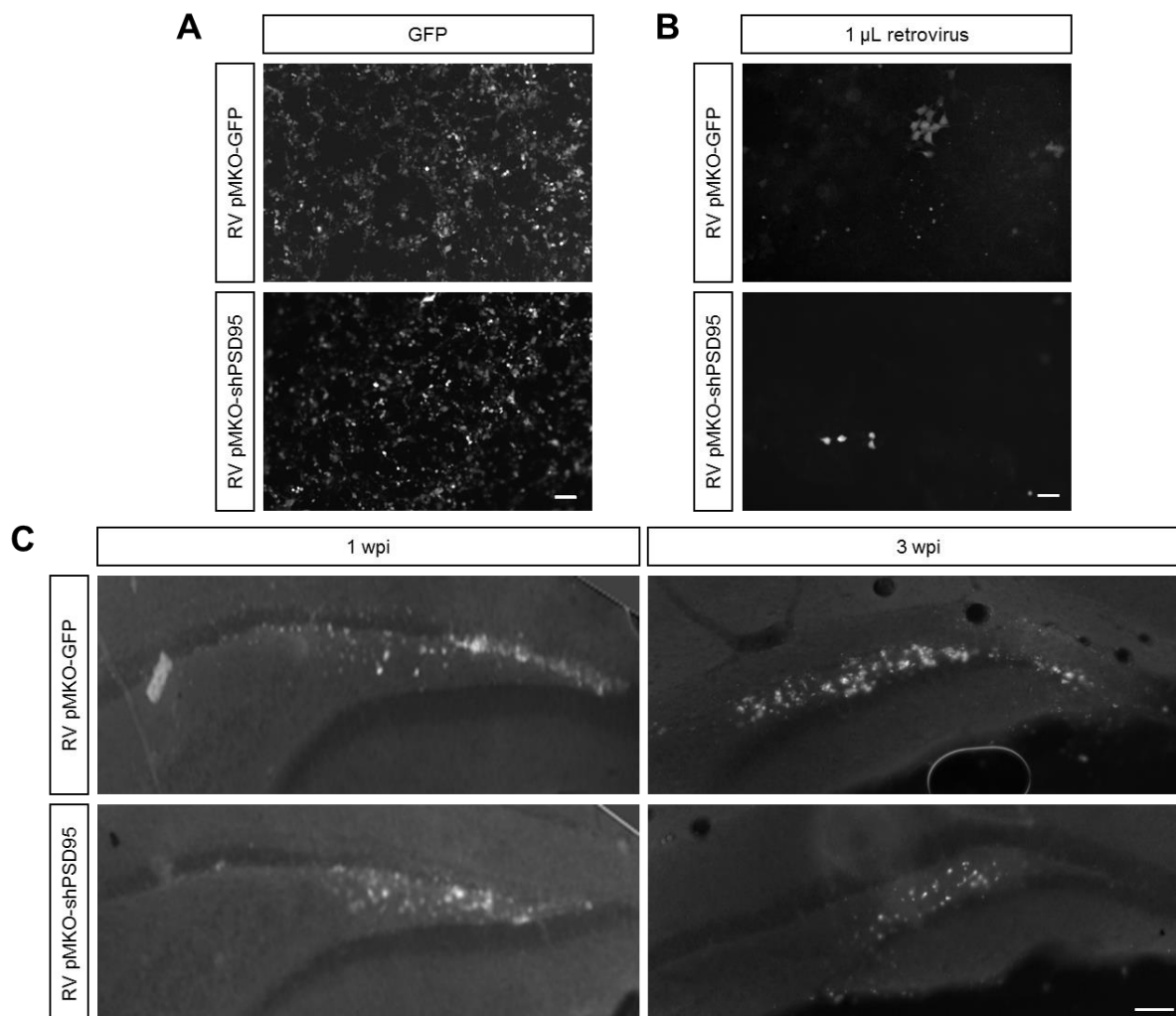


Figura 11. Eficiencia de transfección e infección de pMKO-GFP y pMKO-shPSD95-GFP *in vitro* e *in vivo* luego de la inyección del retrovirus en el giro dentado del ratón adulto. Se observa la alta eficiencia de transfección de las células empaquetadoras de virus con pMKO-GFP y pMKO-shPSD95-GFP, como también su baja infección. **A.** Transfección de células HEK293T con PEI Max y los vectores pMKO más los vectores que proporcionan la maquinaria necesaria para el empaquetamiento del virus. Barra de tamaño: 10 µm. **B.** Infección de células HEK293T con 1 µL de retrovirus pMKO-GFP y pMKO-shPSD95-GFP. Barra de tamaño: 10 µm. **C.** Se observan cortes coronales de cerebro de animales operados mediante cirugía estereotáxica a los cuales se les inyectó 1,5 µL de cada uno de los retrovirus y su sacrificio a 1 y 3 wpi. Es posible observar solo restos fluorescentes en el hilum, es decir no se observan células infectadas, por lo que se descartan los retrovirus utilizados. Barra de tamaño: 10 µm.

8.4 Silenciamiento de PSD-95 en células N2a mediante retrovirus utilizando el vector pSIREN-shPSD95

El nuevo vector utilizado fue el vector de expresión retroviral RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 (figura 7). Se utilizaron dos vectores usando como base este vector, los cuales tienen un gen que codifica para la proteína fluorescente verde ZsGreen. Uno de estos vectores expresa un shRNA control (shC) y pesa 6.600 pb, y el otro expresa shRNA que hibrida mediante apareamiento de bases con el mRNA de PSD-95 (shPSD95) y pesa 6.632 pb.

Los vectores se purificaron mediante una extracción de DNA a gran escala según se describió en los materiales y métodos. Posterior a la extracción de DNA se realizó un ensayo de restricción con las enzimas de restricción MluI y AgeI, esperando obtener dos fragmentos de DNA correspondientes a 6.000 y 600 pb en el caso del vector pSIREN-shC, mientras que para el vector pSIREN-shPSD95 se esperaban dos fragmentos de DNA correspondientes a 6.022 pb y 610 pb. Cabe mencionar que la utilización de la enzima MluI es importante debido a que genera un sitio de restricción dentro del inserto, por lo tanto verifica que está presente el shRNA de interés (figura 7B). Los fragmentos de DNA fueron visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 12), obteniéndose como resultado el tamaño (pb) esperado.

Con el fin de comprobar el correcto y eficiente silenciamiento de la expresión de shPSD95 en ratón, se transfectaron células N2a con los vectores shC y shPSD95 utilizando Lipofectamina 3000. A las 48 h de transfección se estimó el porcentaje de células ZsGreen+, obteniéndose un 90-100% de eficiencia de transfección (figura 13A) en los tres experimentos independientes realizados tanto en las células transfectadas con shC como con shPSD95. A través de qRT-PCR se determinó que los niveles de mRNA de PSD-95 disminuye en un 60% en células transfectadas con shPSD95 comparado con las células transfectadas con shC (figura 13B).

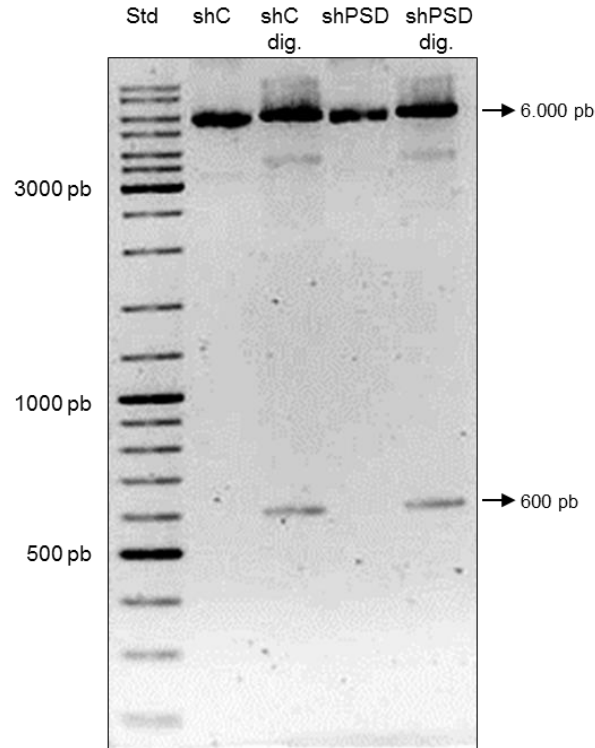


Figura 12. Purificación de vectores pSIREN y ensayo de restricción. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observa la correcta extracción y purificación de los vectores pSIREN-shC y pSIREN-shPSD95. En el carril 1 se observa el estándar de peso molecular que fluctúa entre los 10.000 y 100 pb, en el segundo carril se encuentra el vector pSIREN-shC, en el tercer carril se encuentra el vector pSIREN-shC digerido con las enzimas MluI y AgeI, en el cuarto carril se encuentra el vector pSIREN-shPSD95 y en el quinto carril se encuentra el vector pSIREN-shPSD95 digerido con las enzimas MluI y AgeI.

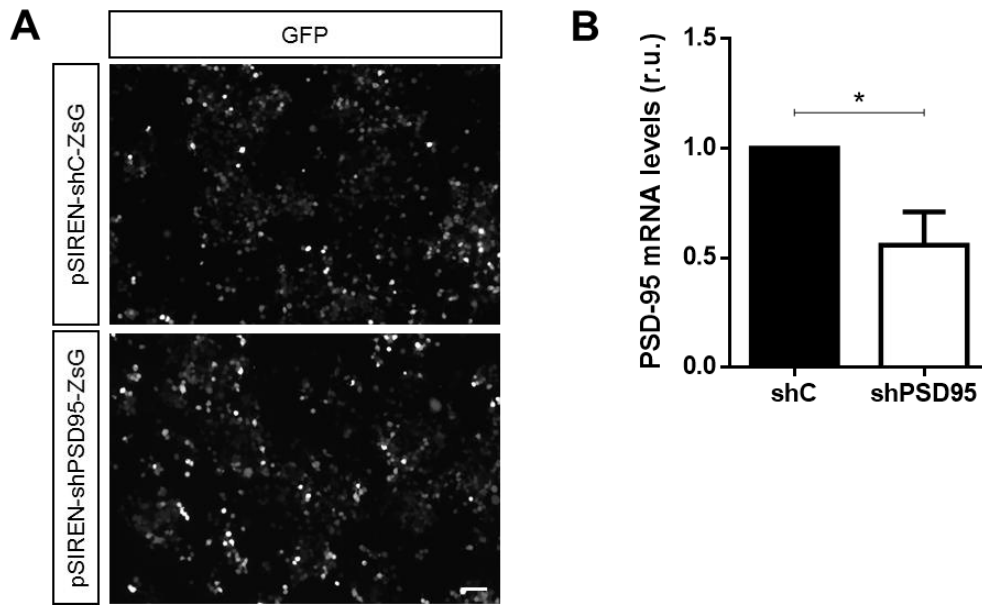


Figura 13. El shRNA disminuye la expresión de PSD-95 en N2a transfectadas con vectores retrovirales. Se observa la eficiencia de transfección y la disminución de la expresión de PSD-95 mediante qRT-PCR. **A.** Imágenes representativas de porcentaje de eficiencia de transfección. Barra de tamaño: 10 μ m. **B.** Análisis de qRT-PCR donde se cuantifica la disminución de la expresión de PSD-95 en células N2a transfectadas con el vector de silenciamiento control (shC) y el vector de silenciamiento contra PSD-95 (shPSD95). Las barras representan el promedio \pm S.E. * $p < 0.05$, Student's t-test (N=3).

Una vez comprobado el eficiente silenciamiento de la expresión de shPSD95, se generaron y concentraron retrovirus expresando shC y shPSD95, los cuales se utilizaron para inyectarlos en el hipocampo de ratones adultos, con el fin de analizar el efecto de PSD-95 *in vivo*.

Células HEK293T se transfectaron con los vectores shC y shPSD95 más vectores CMV (gag-pol) y VSV-G, las cuales fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia previo a la concentración del retrovirus, estimándose que el porcentaje de células ZsGreen+ es de un 98-100% tanto en shC como en shPSD95 (figura 14A). Luego de la concentración del retrovirus y su posterior resuspensión, se determinó el título viral de cada uno de los retrovirus en células HEK293T mediante el protocolo y la fórmula 1 mencionada en materiales y métodos. Se observó el pocillo con células infectadas con 1 μ L de retrovirus shC y shPSD95 con el fin de demostrar la alta eficiencia de infección de los retrovirus concentrados (figura 14B). Se determinó que los retrovirus shC y shPSD95 tenían un título viral de 10^6 unidades formadoras de colonias/ μ L.

Se infectaron células N2a con los retrovirus purificados y concentrados mediante ultracentrifugación, estimándose que el porcentaje de células infectadas (ZsG+) fue entre 90-100% (figura 14C) en los tres experimentos independientes realizados tanto en las células transfectadas con shC como con shPSD95. Al determinar los niveles de mRNA mediante qRT-PCR, se observó que en células infectadas shPSD95 disminuye un 80% la expresión de mRNA de PSD-95 comparado con las células infectadas con shC (figura 14D).

Finalmente, la eficiencia de silenciamiento de infección fue analizada por western blot (figura 14E), donde se obtuvo como resultado que las células infectadas con shPSD95 disminuyeron la expresión de PSD-95 en aproximadamente un 60% comparado con las células infectadas con shC (figura 14F).

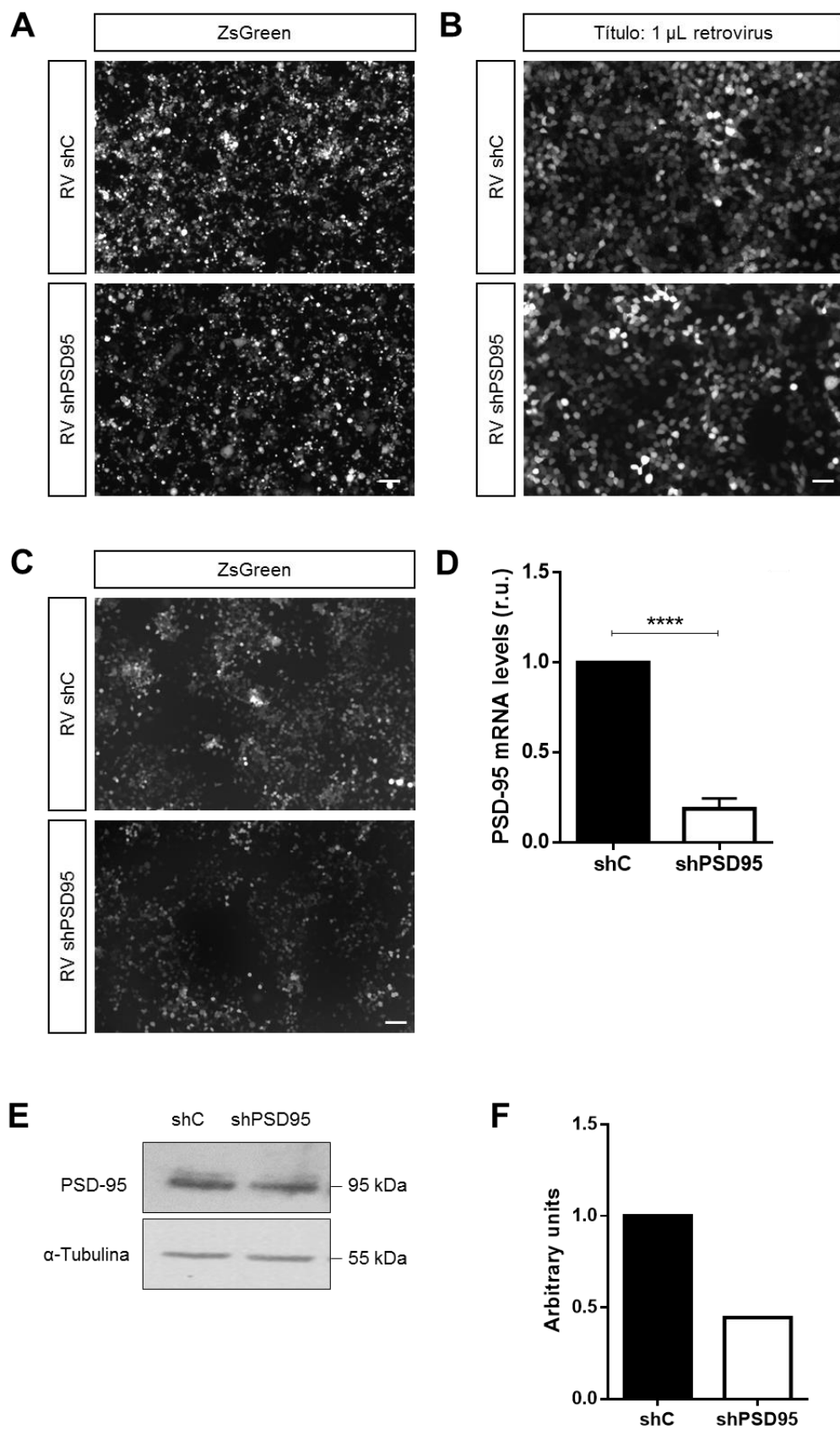


Figura 14. El shRNA disminuye la expresión de PSD-95 en N2a infectadas con retrovirus. Se observa la disminución de la expresión de PSD-95 mediante qRT-PCR y western blot, y la eficiencia de transfección e infección de los retrovirus concentrados por ultracentrifugación. **A.** Transfección de células HEK293T con PEI Max y los vectores shC y shPSD95 más los vectores que proporcionan la maquinaria necesaria para el empaquetamiento del virus. Se observan aproximadamente un 98% de células que expresan el marcador ZsGreen. Barra de tamaño: 10 μ m. **B.** Infección de células HEK293T con 1 μ L de retrovirus shC y shPSD95. Barra de tamaño: 10 μ m. **C.** Imágenes representativas de porcentaje de eficiencia de transfección. Barra de tamaño: 10 μ m. **D.** Análisis de qRT-PCR donde se cuantifica la disminución de la expresión de PSD-95 en células N2a infectada con el retrovirus silenciamiento control (shC) y el vector de silenciamiento contra PSD-95 (shPSD95). Las barras representan el promedio \pm S.E. * $p < 0.05$, Student's t-test (N=3). **E.** Western blot de lisado de proteínas de células N2a infectadas con shC y shPSD95 donde se observa una banda única correspondiente a PSD-95 y una leve disminución en shPSD95 respecto a shC. **F.** Cuantificación de unidades relativas para determinar la disminución de la expresión de PSD-95 correspondiente al western blot (N=1).

8.5 Análisis del efecto del silenciamiento de PSD-95 sobre etapas tempranas de la neurogénesis

Para establecer el papel de PSD-95 en la neurogénesis hipocampal *in vivo*, se inyectaron los retrovirus shC y shPSD95 en el hipocampo de ratones de 2 meses de edad, los cuales se sacrificaron a las 2 wpi para determinar la morfología dendrítica de las nuevas neuronas (células ZsG+/DCX+), donde se realizaron análisis de diferenciación neuronal, migración de las nuevas neuronas a través de la GCL y largo total dendrítico de estas mismas células. Además, se sacrificaron animales a las 4 wpi para determinar la complejidad dendrítica de las nuevas neuronas (células ZsG+/NeuN+), donde se realizó análisis de migración de las nuevas neuronas a través de la GCL, largo total dendrítico, número total de intersecciones, número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, como también a cantidad de intersecciones que se encontraron en círculos concéntricos de 10 μ m de distancia a partir del soma de la neurona. Finalmente, se sacrificaron animales a las 6 wpi para determinar la formación de espinas dendríticas (figura 6).

En primer lugar, y como control, se evaluó el papel de PSD-95 en las etapas tempranas de la neurogénesis como la diferenciación y la migración, con el fin de determinar que el silenciamiento de la proteína de interés no afectaba dichas etapas fundamentales de la neurogénesis.

A las 2 wpi, para determinar la diferenciación neuronal y con ello el compromiso neuronal, se evaluó en células expresan la proteína ZsGreen la expresión del marcador de neurona inmadura DCX, es decir se tomaron en cuenta células que fueran ZsG+/DCX+ en relación al total de células ZsG+ (figura 15A). Las células infectadas con shPSD95 no presentaron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de neuronas inmaduras con respecto al shC, obteniéndose entre un 50-70% de diferenciación, lo que sugiere que PSD-95 no estaría involucrado en la diferenciación neuronal (figura 15B).

En estos animales inyectados con shC y shPSD95 se determinó el porcentaje de migración de las nuevas neuronas a través de la GCL a 2 wpi y a 4 wpi, donde se tomó como referencia el soma de las células. Para este análisis se determinó como 0% la SGZ,

mientras que como 100% el fin de la GCL y el inicio de la ML (figura 16A). Se sabe que las neuronas generadas en el cerebro adulto solo migran por el primer tercio de la capa molecular (Kempermann *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2005), por lo que mediante el marcador de núcleo NucBlue, se delimitó la GCL, además se utilizó el anticuerpo ZsG con el cual se amplificó la señal de las células infectadas con los retrovirus y el marcador molecular DCX para neuronas inmaduras para analizar las células a 2 wpi, mientras que se utilizó el marcador molecular NeuN para neuronas maduras para analizar las células a 4 wpi. Cabe mencionar que DCX se expresa transitoriamente en neuroblastos recién generados y en neuronas inmaduras y su expresión disminuye a medida que los marcadores neuronales maduros comienzan a expresarse (Brown *et al.*, 2003), durante la fase de maduración post-mitótica temprana que ocurre entre 7 a 28 días (Song *et al.*, 2012). Cuando comienza a disminuir la expresión de DCX comienza a expresarse NeuN que es un marcador de neuronas maduras, el cual se expresa durante la fase de maduración post-mitótica tardía que ocurre entre los 28 y 56 días (Song *et al.*, 2012), es decir permite diferenciar neuronas granulares glutamatérgicas (Hsieh *et al.*, 2012).

En la figura 16B y 16D se observan células infectadas con los retrovirus shC y shPSD95 a 2 y 4 wpi respectivamente, las cuales expresan la proteína fluorescente verde ZsG+ además del marcador molecular de neuronas inmaduras DCX o marcador de neuronas maduras NeuN. Todas las células ZsG+/DCX+ y ZsG+/NeuN+ fueron analizadas. Se observó que las células infectadas con el retrovirus shPSD95 y con el retrovirus shC a 2 y 4 wpi presentan una distribución normal a través de la GCL, es decir estas nuevas neuronas se mantienen en el primer tercio de la GCL (Esposito *et al.*, 2005; Kempermann *et al.*, 2003) sin presentar cambios en la migración a través de ella (figura 16C y 16E).

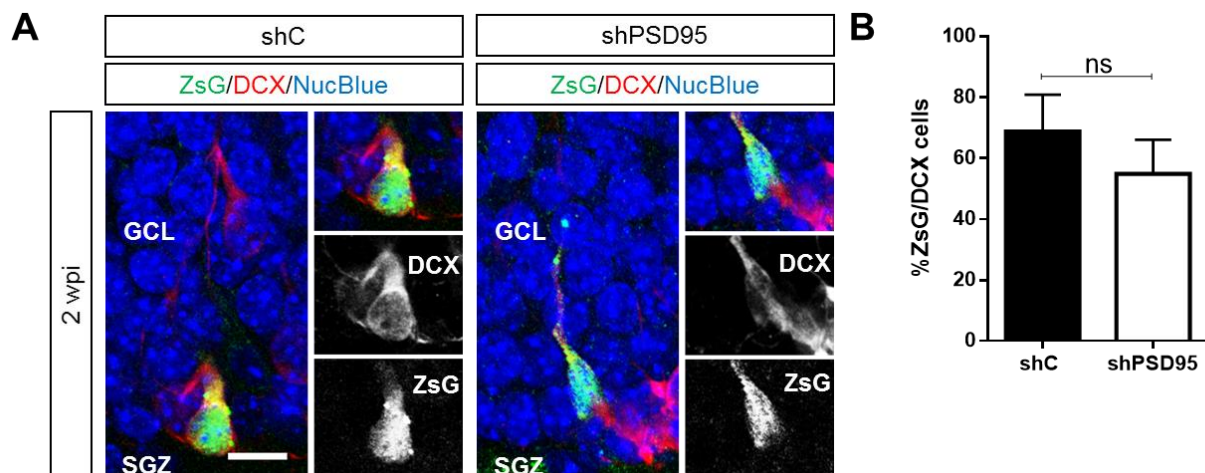


Figura 15. shPSD95 no afecta la diferenciación neuronal. En la etapa de diferenciación se observan las células infectadas con shC y shPSD95 (ZsG+) que expresan el marcador de neurona inmadura DCX. **A.** Inmunofluorescencia con los marcadores ZsG, DCX y NucBlue en cortes de cerebro de animales sacrificados a 2 wpi. Barra de tamaño: 10 μ m. **B.** Cuantificación del porcentaje de células que expresan marcador ZsG y marcador de neurona madura DCX (ZsG+/DCX+) en animales sacrificados a 2 wpi. Las barras representan el promedio \pm S.E. Student's t-test. Ns: no significativo. N shC=4. N shPSD95=6.

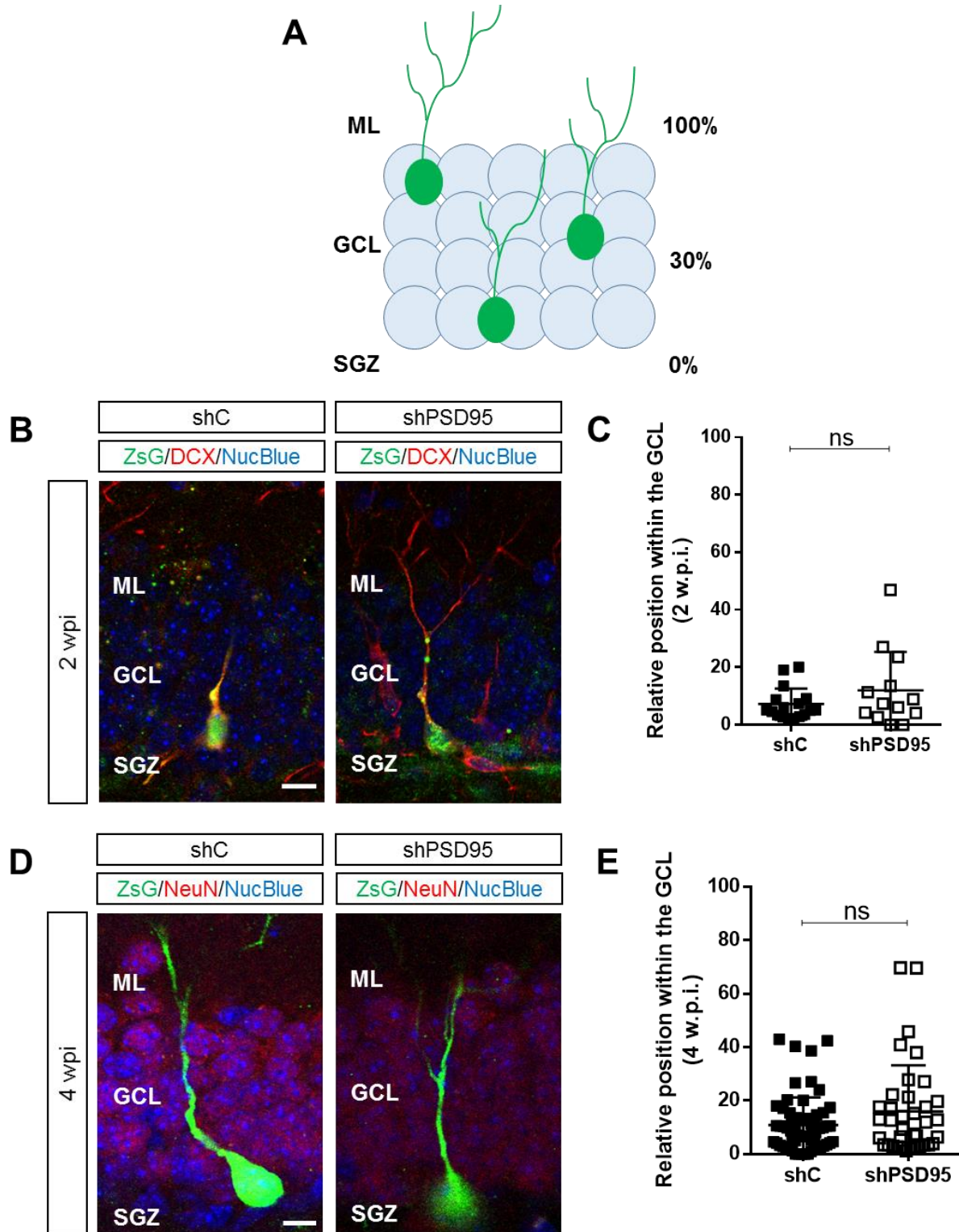


Figura 16. shPSD95 no afecta la migración de las nuevas neuronas. Se observan las células infectadas con shC y shPSD95 (ZsG+) que colocalizan con marcador de neurona inmadura DCX y con el marcador de neurona madura NeuN. **A.** Representación esquemática del método utilizado para cuantificar la migración neuronal a través de la GCL. H: hilio; GCL: capa de células granulares; ML: capa molecular. **B.** Inmunofluorescencia con los marcadores ZsG, DCX y con el marcador nuclear NucBlue en cortes de cerebro de animales sacrificados a 2 wpi. Barra de tamaño: 10 μ m. **C.** Migración de las nuevas neuronas infectadas con shC y shPSD95 a través de la GCL. Las barras representan el promedio \pm S.E. Student's t-test. Ns: no significativo. 2 wpi: N shC=4 (18 células); N shPS95=6 (13 células). **D.** Inmunofluorescencia con los marcadores ZsG, NeuN y con el marcador nuclear NucBlue en cortes de cerebro de animales sacrificados a 4 wpi. Barra de tamaño: 10 μ m. **E.** Migración de las nuevas neuronas infectadas con shC y shPSD95 a través de la GCL. Las barras representan el promedio \pm S.E. Student's t-test. Ns: no significativo. 4 wpi: N shC=4 (62 células); N shPS95=3 (37 células).

8.6 El silenciamiento de PSD-95 no afecta el desarrollo del árbol dendrítico pero si la formación de espinas dendríticas

Una vez que corroboré que el silenciamiento de PSD-95 no afecta etapas tempranas de la formación de nuevas neuronas, procedí a analizar el efecto del silenciamiento sobre el desarrollo del árbol dendrítico y de espinas dendríticas, ambos efectos asociados a la función de PSD-95 (El-Husseini, *et al.*, 2000; Keith and El-Husseini, 2008; Bustos *et al.*, 2014)

Para determinar la arbolización dendrítica, donde se analizó el largo total dendrítico, número total de intersecciones, número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, como también a cantidad de intersecciones que se encontraron en círculos concéntricos de 10 μm de distancia a partir del soma de la neurona, se realizó un análisis donde se observaron las células infectadas con shC y shPSD95 que expresaran la proteína ZsG y el marcador de neurona inmadura DCX (ZsG+/DCX+) para células de 2 wpi, y el marcador de neurona madura NeuN (ZsG+/NeuN+) para células de 4 wpi. Se realizaron reconstrucciones 2D de las células ZsG+/DCX+ y ZsG+/NeuN+, el cual consistió en dibujar (*tracing*) las neuronas positivas para los marcadores mencionados mediante un plugin de ImageJ (figura 17A y 17C), y con el cual se cuantificó la longitud total de sus de dendritas.

A 2 wpi no se observan diferencias significativas en lo que respecta al largo total dendrítico al analizar las células infectadas con shPSD95 comparadas con las células que se infectaron con shC (figura 17B), lo que indica que PSD-95 no estaría involucrado en el desarrollo del árbol dendrítico ni largo dendrítico de las nuevas células generadas en el hipocampo adulto en este estadio de estudio. A 4 wpi las células infectadas con shPSD95 presentan un árbol dendrítico igual de desarrollado que las células que se infectaron con shC, es decir no se presentan diferencias significativas en el largo total dendrítico en ambas condiciones analizadas (figura 17D). Además, se analizaron la cantidad de intersecciones que presentaron neuronas infectadas con ambos virus, donde se pudo observar que las neuronas infectadas con el retrovirus shPSD95 presentan una leve tendencia a aumentar este número comparado con las neuronas infectadas con shC, pero sin presentar resultados significativos (figura 17E).

Además, a 4 wpi, se analizó el número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias y se obtuvo como resultado que las dendritas primarias y secundarias no tienen una diferencia significativa al comparar las neuronas infectadas con el retrovirus shC y con shPSD95, manteniendo el mismo valor en ambas condiciones. Dentro de este mismo análisis se observó una tendencia al aumento de las dendritas terciarias y cuaternarias en las neuronas infectadas con shPSD95 al ser comparadas con las neuronas infectadas con shC, estos valores no fueron significativos pero se correlaciona con el resultado obtenido del aumento en el número total de intersecciones en células infectadas con el retrovirus shPSD95 respecto a células infectadas con shC (figura 17F), es decir las células infectadas con shPSD95 presentan un árbol dendrítico más ramificado a las 4 semanas de haber inyectado un retrovirus. Estos datos sugieren que PSD-95 está involucrado en el desarrollo del árbol dendrítico, aunque no presentándose resultados significativos. Además, no se observan diferencias significativas entre las células infectadas expresando shC y shPSD95 al analizar la complejidad del árbol dendrítico mediante el análisis de Sholl, el cual consiste en realizar círculos concéntricos a lo largo de las dendritas de la neurona con el fin de comparar la cantidad de intersecciones que se encuentran a partir del soma (figura 17G).

Finalmente, para analizar si el silenciamiento de PSD-95 afecta las espinas dendríticas en animales se inyectaron los retrovirus shC y shPSD95 en el hipocampo de ratones de 2 meses de edad, los cuales se sacrificaron a las 6 wpi, puesto que luego de transcurrido este tiempo las espinas ya debieran estar formadas presentando una morfología específica de *mushroom* (Pujadas *et al.*, 2010). Para este análisis se evaluaron las células infectadas con los retrovirus shC y shPSD95 (ZsG+), y se realizaron proyecciones de máxima intensidad (z-stacks) con las imágenes de dendritas adquiridas en el microscopio confocal. Se observó que las células infectadas con shPSD95 presentan menos espinas dendríticas y de menor densidad comparadas con las células infectadas con shC (figura 18), observándose dendritas de menor volumen lo que hizo más difícil la adquisición de las imágenes en el microscopio confocal. En las dendritas de células infectadas con shPSD95 no se observan espinas dendríticas, mientras que en las dendritas de células infectadas con shC si se observan espinas dendríticas.

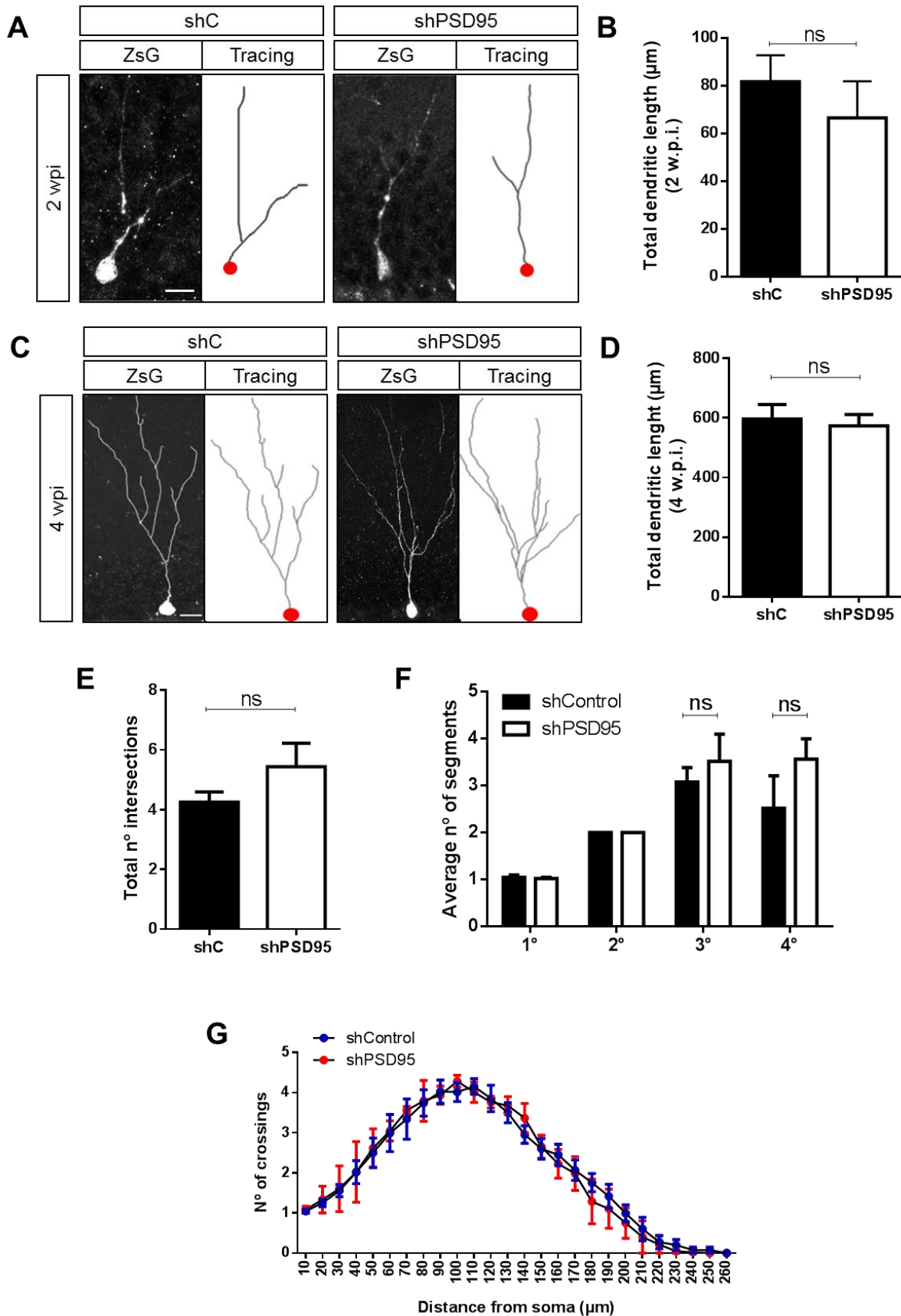


Figura 17. shPSD95 no afecta la arborización dendrítica de células granulares. A y C. Se observan células infectadas con los retrovirus shC y shPSD95 (ZsG+) a 2 wpi y 4 wpi, respectivamente. Además, se observan las reconstrucciones 2D de estas mismas células utilizando el plugin NeuronJ de ImageJ. Barra de tamaño: 10 μ m. Se representa el soma de la neurona con un círculo rojo. **B y D.** Cuantificación del largo total dendrítico de neuronas infectadas con shC y shPSD95 a 2 wpi y 4 wpi, respectivamente. Las barras representan el promedio \pm S.E. Mann-Whitney test. Ns: no significativo. 2 wpi: N shC=4 (14 células); N shPSD95=6 (12 células). 4 wpi: N shC=4 (23 células); N shPSD95=3 (20 células). **E.** Cuantificación del número total de intersecciones de neuronas infectadas con shC y shPSD95 a 4 wpi. Las barras representan el promedio \pm S.E. Mann-Whitney test. Ns: no significativo. N shC=4 (23 células); N shPSD95=3 (20 células). **F.** Promedio de número de segmentos (dendritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias) de neuronas infectadas con retrovirus shC y shPSD95 a 4 wpi. 2-way ANOVA test. Ns: no significativo. N shC=4 (23 células); N shPSD95=3 (20 células). **G.** Análisis de Sholl de complejidad dendrítica de neuronas infectadas con shC y shPSD95 a 4 wpi. N shC=4 (23 células); N shPSD95=3 (20 células).

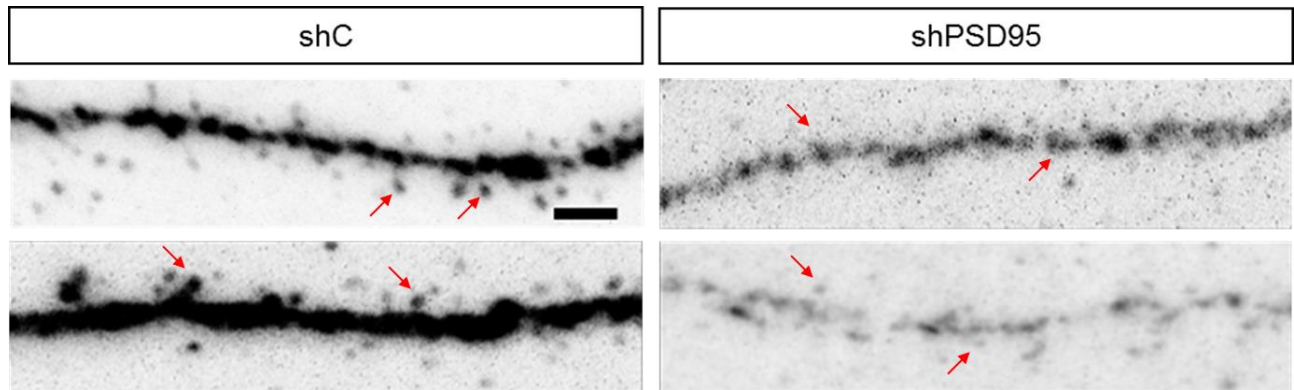


Figura 18. shPSD95 afecta la formación de espinas dendríticas. Se observan dendritas de células granulares maduras infectadas con los retrovirus shC y shPSD95 (ZsG+) a 6 wpi. Ejemplo representativo de proyecciones de máxima intensidad con imágenes adquiridas en microscopio confocal. La flecha indica una espina dendrítica tipo *mushroom*. Barra de tamaño: 2 μm .

9. DISCUSIÓN

La neurogénesis hipocampal adulta es el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales a partir de células precursoras, la cual se lleva a cabo en etapas de proliferación, especificación y maduración en regiones específicas del cerebro (Varela-Nallar *et al.*, 2010), siendo del interés de esta tesis la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Este proceso es importante debido a que se produce tanto en estados de desarrollo embrionario como también en el cerebro adulto de mamíferos (Ming and Song, 2005). Las nuevas neuronas maduras tienen la capacidad de integrarse al circuito hipocampal preexistente debido a la morfología que presentan y a las características sinápticas, lo que las hace ser un importante tema de estudio en lo que respecta a la plasticidad sináptica y función hipocampal.

Para el estudio de la plasticidad sináptica es importante el rol de la proteína de densidad post-sináptica PSD-95, que es una proteína de andamio de la PSD de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas, la cual tiene importantes funciones en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas (Sweet *et al.*, 2011), en la regulación del crecimiento del árbol dendrítico (Charych *et al.*, 2006), como también en el reclutamiento de otras proteínas sinápticas como Dorfin (Park *et al.*, 2015), por lo tanto es fundamental para el establecimiento y refinamiento de los circuitos neuronales.

Actualmente, no se sabe cuál es el papel que tiene la proteína de andamiaje PSD-95 en la neurogénesis hipocampal adulta, por lo que en la presente tesis se propuso analizar el posible papel que pueda tener esta proteína sobre las nuevas neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo adulto, específicamente sobre las neuronas inmaduras y maduras.

Los primeros resultados obtenidos de la presente tesis, demuestran que la proteína sináptica PSD-95 se expresa en la línea celular N2a y en hipocampo de ratón adulto, lo que concuerda con lo reportado el año 2012 por Zheng y el año 2015 por Song. A continuación se determinó la eficiencia del shRNA contra PSD-95 en células N2a, donde se comprobó que el vector pSIREN contiene un shRNA que disminuye los niveles del

mRNA de la proteína sináptica en un 40% luego de ser transfectadas y un 80% luego de ser infectadas con un retrovirus que expresa el shPSD95, lo que ocurre debido a que hay una degradación de la expresión génica del gen blanco la que se logra a través de una vía enzimática que implica la expresión de un complejo de silenciamiento inducido por RNA endógeno (RISC) (Moore *et al.*, 2010). Es decir, la maquinaria propia de la célula permite la degradación del mRNA mediante la acción de este complejo. De acuerdo a lo mencionado, cabe destacar que la transfección de las células N2a no supera el 70%, lo que podría estar afectando el efecto de la disminución de PSD-95. Además, se observó la disminución de la expresión de PSD-95 a nivel de proteínas luego de infectar las células N2a con el retrovirus, obteniéndose como resultado una disminución de un 60% en los niveles proteicos de PSD-95, advirtiéndose una mayor disminución en niveles de mRNA que en proteínas, lo que puede deberse a que la vida media de esta proteína es de 36 horas (Gray *et al.*, 2006; Ehlers, 2003; El-Husseini *et al.*, 2002).

Una vez que se comprobó la disminución eficiente del shRNA contra PSD-95 *in vitro*, se inyectaron los retrovirus en el giro dentado del ratón adulto mediante cirugía estereotaxica, donde se evaluaron las etapas tempranas de la neurogénesis como la diferenciación y migración de las nuevas neurona, como también el desarrollo de árbol dendrítico y de espinas dendríticas mediante marcadores moleculares DCX y NeuN.

La diferenciación neuronal y la migración a través de la capa de células granulares son etapas tempranas de la neurogénesis, las que se evaluaron para determinar si el silenciamiento de PSD-95 *in vivo* las afectaba y con ello saber si esto afectaría la generación de neuronas y su posicionamiento, lo que podría afectar el desarrollo normal del árbol dendrítico. De acuerdo a lo mencionado, la etapa temprana de diferenciación neuronal en ratones jóvenes es normalmente entre 70-80% (van Praag *et al.*, 1999; Encinas *et al.*, 2011), lo que concuerda con lo reportado en esta tesis donde a las 2 wpi se determinó que al disminuir la expresión de PSD-95 no se veía afectada la diferenciación neuronal, la cual muy similar a lo observado en ratones que expresan shC y shPSD95. Además, en lo que respecta a la migración celular, otra etapa temprana de neurogénesis, las neuronas adultas no se distribuyen al azar en el giro dentado, sino que permanecen en el primer tercio de la GCL (Kempermann *et al.*, 2003; Esposito *et al.*,

2005), lo cual se observó en las nuevas neuronas infectadas con shC y shPSD95, las cuales se mantuvieron la capa interna de la GCL.

Luego de determinar que el silenciamiento de PSD-95 no afectaba las etapas tempranas, se analizó el desarrollo del árbol dendrítico a 2 y 4 wpi. Observé que no hay diferencias en el largo total dendrítico de células infectadas con el retrovirus shC y shPSD95 en ambos tiempos de estudio; cabe mencionar que el largo total dendrítico obtenido a las 4 wpi es mayor al observado en células de 2 wpi, donde a 4 wpi se obtuvo un largo de aproximadamente 600 μm en ambas condiciones, mientras que a 2 wpi se obtuvo un largo entre 60 y 80 μm . En el año 2006, Charych *et al.*, observó que al disminuir la expresión de PSD-95 con un oligonucleótido antisentido había una disminución en el largo total dendrítico en cultivo de neuronas hipocampales a los 12 días *in vitro*, por lo que se vio afectado el crecimiento dendrítico (Charych *et al.*, 2006); esto se observó en los resultados obtenidos sin diferencias significativas entre ambas condiciones, por lo cual se puede mencionar que PSD-95 no afecta el desarrollo neuronal en estadios tempranos de desarrollo.

Existen estudios donde se utilizó un shRNA contra PSD95 en neuronas hipocampales maduras, con lo que se observó un aumento en la agrupación de subunidades NR2B del receptor NMDA y una inducción de dendritogénesis y además es capaz de inducir la ramificación dendrítica en neuronas inmaduras *in vitro* (Bustos *et al.*, 2014). Además, en otro estudio se menciona que al disminuir la expresión de PSD-95 con un oligonucleótido antisentido aumenta la cantidad de dendritas primarias y secundarias debido a la unión de cypin que es una proteína no sináptica que interactúa con PSD-95 en el citosol (Akum *et al.*, 2004), la que permite estabilizar la ramificación dendrítica al regular negativamente la localización de PSD-95 (Firestein *et al.*, 1999). En estudios donde se mutó el dominio SH3 de PSD-95 se observó que al transfectar neuronas hipocampales *in vitro* existía un aumento en el número de intersecciones al comparar con neuronas GFP y con neuronas transfectadas sobreexpresando PSD-95, las cuales disminuyeron significativamente el número de intersecciones al comparar con el control (Sweet *et al.*, 2011). Otros estudios afirman que PSD-95 regula la dendritogénesis mediante la interacción directa con la proteína EB3 (end-binding protein 3) (Sweet *et al.*, 2011) la cual permitirá regular la

dinámica de los microtúbulos y con ello regular el desarrollo de la dendritogenésis (Kulkarni *et al.*, 2012) y con ello el largo dendrítico y las ramificaciones dendríticas. Estas evidencias sugieren que PSD-95 está involucrado en el desarrollo morfológico y que los resultados obtenidos podrían correlacionarse puesto que se observa una tendencia al aumento en la cantidad de intersecciones y dendritas terciarias y cuaternarias, pero sin resultados significativos.

Finalmente, en lo que respecta a las espinas dendríticas, determiné que en neuronas infectadas con el retrovirus que expresa el shPSD95 había una disminución de espinas dendríticas y del volumen de la dendrita comparadas con las neuronas infectadas con el retrovirus shC que presentaban espinas maduras. En diversos estudios se afirma que al transfectar neuronas hipocampales con un shRNA-PSD95 y analizarlas a los 20 días *in vitro* se observan una pérdida significativa en las espinas maduras y un incremento en número de tallos sinápticos (*shaft*) y filopodios (Bustos *et al.*, 2014). Además, en otros estudios donde se sobreexpresó PSD-95 en neuronas hipocampales se observó que aumenta el volumen de las espinas y el área de la densidad post-sináptica (El-Husseini *et al.*, 2000). Esto se debe a que durante el desarrollo, las espinas se forman y eliminan a medida que se establecen redes neuronales, y por lo tanto cuando las espinas se forman en ausencia de PSD-95, las cascadas de señalización normales pueden ser alteradas y, aunque se forman sinapsis, el proceso de establecer redes funcionales es anormal y podría resultar en una reducción o aumento de la densidad de la espina (Vickers *et al.*, 2006). De acuerdo a estas afirmaciones, se establece que al utilizar un shRNA-PSD95 hay una pérdida irregular de PSD en las sinapsis maduras, lo que afecta a la morfología de las espinas dendríticas (Steiner *et al.*, 2008) y por lo tanto a la plasticidad sináptica (Nakagawa *et al.*, 2004). Finalmente, debido a la disminución de PSD-95 se espera que disminuyan la cantidad de proteínas que interactúan con dicha proteína sináptica, como también los receptores de neurotransmisores, canales iónicos, moléculas de señalización y adhesión, proteínas de anclaje y elementos del citoesqueleto (Keith *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2003). De acuerdo a esto, se afirma que PSD-95 es una proteína relacionada con la maduración sináptica.

Según estudios en animales *knockout* de PSD-95, se observó que hay un incremento en la expresión de la proteína sináptica SAP-102, la cual se une al receptor NR2B en neuronas inmaduras, en extractos de hipocampo (Elias *et al.*, 2006; Cuthbert *et al.*, 2007), lo que sugiere que hay un mecanismo compensatorio gracias a la función de SAP-102 (Nagura *et al.*, 2012). Además, se menciona que en estos mismo animales, que el reemplazo de la subunidad NR2B con la subunidad NR2A falla durante la maduración sináptica (Beique *et al.*, 2006; Elias *et al.*, 2008), lo cual podría estar ocurriendo en los resultados obtenidos en esta tesis, y debido a ello no es posible observar los efectos de PSD-95 *in vivo* en lo que respecta al desarrollo del árbol dendrítico.

Por lo tanto, de acuerdo a la literatura existente sobre PSD-95 se puede afirmar que esta proteína sináptica regula el desarrollo de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo de cerebro de ratón adulto, pudiendo regular la estructura neuronal, contribuyendo al establecimiento de las sinapsis y con ello tener una función en la plasticidad sináptica, y según los resultados de morfología obtenidos en esta tesis demuestran que PSD-95 no tiene un efecto en las etapas tempranas de la neurogénesis, pero si un posible efecto en el desarrollo del árbol dendrítico de neuronas maduras, y un efecto notable en la formación de espinas dendríticas, donde se observó que hay una disminución considerable en el volumen de las dendritas.

10. CONCLUSION Y PROYECCIONES

Se ha demostrado previamente que PSD-95 tiene un papel primordial en la maduración de las neuronas, como también en los circuitos neuronales y en la plasticidad, pero no se conoce su papel en la neurogénesis hipocampal adulta.

En la presente tesis se utilizó la herramienta de la inyección de un retrovirus que contiene un shRNA contra PSD-95 en el giro dentado del hipocampo, donde no se observaron efectos significativos en lo que respecta a la morfología del árbol dendrítico en las neuronas inmaduras y maduras pero si una leve tendencia al aumento en el largo total dendrítico y en el número de intersecciones. Un resultado importante y claro fue la formación de las espinas dendríticas, las cuales presentaron una morfología de filopodio cuando se disminuía la expresión de la proteína sináptica en estudio comparadas con las neuronas infectadas con el retrovirus control donde se observaron espinas dendríticas maduras, efecto observado a las 6 wpi.

De acuerdo a esto, PSD-95 podría tener un papel importante en la neurogénesis en lo que respecta al desarrollo morfológico en nuevas neuronas, lo cual no pudo ser afirmado en su totalidad debido a que la cantidad de animales analizados no fue suficiente, como también la cantidad de células infectadas con cada uno de los retrovirus, destacando que la cantidad de células infectadas con el retrovirus shPSD95 era menor a la cantidad de células infectadas con shC.

Las proyecciones de este trabajo son aumentar la cantidad de células analizadas aumentando la cantidad de animales y con ello analizar y observar significativamente la expresión de un knockdown de PSD-95, como también una sobreexpresión de esta misma proteína. Además, observar que ocurre con otras proteínas sinápticas como PSD-93 y SAP-102 al disminuir la expresión de PSD-95. Finalmente, y una de las proyecciones más importantes, es analizar el efecto de la disminución de PSD-95 sobre enfermedades neurodegenerativas como el autismo, Alzheimer, esquizofrenia y Huntington, en las que existe una correlación entre ellas y los niveles de proteína de PSD-95 (Feyder *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010; Fourie *et al.*, 2013).

11. REFERENCIAS

Aimone, J. B., Wiles, J. and Gage F. H. (2006). "Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories". *Nat Neurosci.* 9:723–727.

Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., Gage, F. H. (2014). "Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition". *Physiol Rev.* 94:991–1026.

Akum, B. F., Chen, M., Gunderson, S. I., Riefler, G. M., Scerri-Hansen, M. M., Firestein, B. L. (2004). "Cypin regulates dendrite patterning in hippocampal neurons by promoting microtubule assembly. *Nat Neurosci.* 7:145–152.

Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. and Wenthold, R. J. (2007). "NMDA diheteromeric receptor and associated protein in rat hippocampus". *J Neurosci.* 27:8334-8343.

Alvarez-Buylla, A. and García-Verdugo, J. M. (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone". *J Neurosci.* 22:629-34.

Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D. (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells". *Nat Rev Neurosci.* 2:287–293.

Archer, T. C., Jin, J. and Casey, E. S. (2011). "Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis". *Developmental biology.* **350**:429-440.

Bast, T. (2007). "Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior". *Rev Neurosci.* **18**:253–281.

Beattie, E.C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M. and Malenka, R. C. (2000). "Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD". *Nat. Neurosci.* **3**:1291–1300.

Beique, J. C., Lin, D. T., Kang, M. G., Aizawa, H., Takamiya, K., Huganir, R. L. (2006). "Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95". *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**:19535-19540.

Bergles, D. E., Diamond, J. S. and Jahr, C. E. (1999). "Clearance of glutamate inside the synapse and beyond". *Curr Opin Neurobiol*. **9**:293-8.

Bustos, F., Varela-Nallar, L., Campos, M., Henriquez, B., Phillips, M., Opazo, C., Aguayo, L. G., Montecino, M., Constantine-Paton, M., Inestrosa, N. C. and van Zundert, B. (2014). "PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors". *PLoS One*. **9**:e94037.

Bustos, F., Aguilar, R., Varela-Nallar, L., Falahi, F., Montecino, M., Rots, M. and van Zundert, B. (2014). "Targeted epigenetic silencing of PSD-95 with artificial transcription factors recovers arborization in mature hippocampal neurons". Tesis doctoral, manuscrito en preparación.

Bonaguidi, M. A., Wheeler M. A., Shapiro J. S., Stadel R. P., Sun G. J., Ming G. L. and Song, H. (2011). "In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics". *Cell*. **145**:1142-1155.

Broadhead, M., Horrocks, M., Zhu, F., Muresa, L., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., Ficker, D., Kopanitsa, M., Duncan, R., Klennerman, D., Komiyama, N., Lee, S. and Grant, S. (2016). *Nature, Scientific Reports*. **6**:24626.

Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. and Kuhn, H. G. (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis". *J Comp Neurol*. **467**:1–10.

Bruel-Jungerman, E., Davis, S. and Laroche, S. (2007). "Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four". *Neuroscientist*. **13**:492-505.

Charych, E., Akum, B., Goldberg, J., Jörnsten, R., Rongo, C., Zheng, J., Firestein, B. (2006). "Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95". *The Journal of Neuroscience*. **26**:10164-10176.

Cheng, M. C., Lu, C. L., Luu, S. U., Tsai, H. M., Hsu, S. H., Chen, T. T., & Chen, C. H. (2010). "Genetic and functional analysis of the DIG4 gene encoding the post-synaptic density protein 95 in schizophrenia". *PLoS ONE*, **5**:12.

Clinton, S.M., Haroutunian, V., Davis, K.L., Meador-Woodruff, J.H. (2003). "Altered transcript expression of NMDA receptor-associated postsynaptic proteins in the thalamus of subjects with schizophrenia". *Am J Psychiatry*. **160**:1100–1109.

Cull-Candy, S. G., Brickley, S. and Farrant, M. (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease". *Curr Opin Neurobiol*. **11**:327-335.

Cuthbert, P. C., Stanford, L. E., Coba, M. P., Ainge, J. A., Fink, A. E., Opazo, P., Delgado, J. Y., Komiyama, N. H., O'Dell, T. J., Grant, S. G. (2007). "Synapse-associated protein 102/dlg3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies". *J Neurosci*. **27**:2673-2682.

Deng, W., Aimone, J. B. and Gage, F. H. (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?". *Nat Rev Neurosci*. **11**:339-350.

Ehlers, M.D. (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting". *Neuron*. **28**:511–525.

Ehlers, M. D. (2003). "Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system". *Nat Neurosci*. **6**:231–242.

El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S. (2000). "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses". *Science* **290**:1364-1368.

El-Husseini, A. E., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R. and Brecht, D. (2002). "Synaptic strength regulated by glutamate cycling on PSD-95". *Cell*. **108**:849-863.

Elias, G. M., Funke, L., Stein, V., Grant, S. G., Brecht, D. S., Nicoll, R. A. (2006). "Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins". *Neuron*. **52**:307-320.

Elias, G. M., Elias, L. A., Apostolides, P. F., Kriegstein, A. R., Nicoll, R. A. (2008). "Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP-102 and PSD-95 underlies synapse development". *Proc Natl Acad USA*. **105**:20953-20958.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus". *Nat. Med.* **4**:1313–1317.

Encinas, J. M., Vaahtokari, A., and Enikolopov, G. (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain". *Methods Cell Biol.* **85**: 243-72.

Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A. (2011). "Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus". *Cell Stem Cell*. **8**:566–79.

Epp, J. R., Chow, C. and Galea, L. A. (2013). "Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis". *Front Neurosci.* **7**:57.

Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J. and Schinder, A. F. (2005). "Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development". *J Neurosci.* **25**:10074-10086.

Feyder, M., Karlsson, R.M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M.L., Ihne, J., Camp, M., Graybeal, C., Strathdee, D., Begg, A., Alvarez, V.A., Kirsch, P., Rietschel, M., Cichon, S., Walter, H., Meyer-Lindenberg, A., Grant, S.G., Holmes, A. (2010). "Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome". *Am J Psychiatry.* **167**:1508–1517.

Firestein, B. L., Brenman, J. E., Aoki, C., Sanchez-Perez, A. M., El-Husseini, A. E., Bredt, D. S. (1999). "Cypin: a cytosolic regulator of PSD-95 postsynaptic targeting". *Neuron.* **24**:659–672.

Fourie, C., Kim, E., Waldvogel, H., Wong, J. M., McGregor, a, Faull, R. L. M. Montgomery, J. M. (2014). "Differential changes in postsynaptic density proteins in postmortem

huntington's disease and parkinson's disease human brains". *The Journal of Neurodegenerative Diseases*.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells". *Science*. **287**:1433–1438.

Gallo, V. and Ghiani, C. A. (2000). "Glutamate receptors in glia. New cells, new inputs and new functions". *Trends in Pharmacol*. **21**:252-8.

Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L. and Song, H. (2006). "GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain". *Nature*. **439**:589-59.

Ge, S., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G. L., and Song, H., (2007). "A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain". *Neuron*. **54**:559-566.

Gerrow, K., Romorini, S., Nabi, S. M., Colicos, M. A., Sala, C. and El-Husseini, A. (2006). "A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development". *Neuron*. **49**:547-562.

Gray, N., Weimer, R., Bureau, I., Svoboda, K. (2006). "Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the Neocortex in vivo". *Plos Biology*. **4**:e370.

Hagemann, T. L., Paylor, R. and Messing, A. (2013). "Deficits in adult neurogenesis, contextual fear conditioning, and spatial learning in a GFAP mutant mouse model of alexander disease". *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. **33**:18698-18706.

Hsieh, J. (2012). "Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis". *Genes Dev*. **26**:1010-1021.

Keith, D. and El-Husseini, A. (2008). "Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse". *Front Mol Neurosci* **1**:4-12.

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F. H. (2003). "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice". *Development*. **130**: 391-399.

Kennedy, M. (2000). "Signal-processing machines at the postsynaptic density". *Science*. **290**, 750.

Kim, E. and Sheng, M. (2004). "PDZ domain proteins of synapses". *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:771-781.

Kolb, B. and Whishaw, I. Q. (1998). "Brain plasticity and behavior". *Rev Psychol.* **49**:43-64.

Kulkarni, V., Firestein, B. (2012). "The dendritic tree and brain disorders". *Molecular and Cellular Neuroscience*. **50**: 10–20.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein". *Cell*. **60**:585–595.

Lim, I., Merrill, M., Chen, Y. and Hell, J. (2003) "Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect. *Neuropharmacology*. **45**: 738–754.

Lin, J.W., Ju, W., Foster, K., Lee, S. H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., Wang, Y. T. and Sheng, M. (2000). "Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization". *Nat. Neurosci.* **3**:1282-1290.

Losi, G., Prybylowsky, K., Fu, Z., Luo, J. and Wenthold, R. J. (2003). "PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat". *Journal of physiology*. **548**.1:21-29.

Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V. and Giachino, C. (2010). "Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging". *Cell Stem Cell*. May **7**;6(5):445-56.

Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E.C., Carroll, R.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1999). "Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity". *Neuron*. **24**:649–658.

Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G. L. and Song, H. (2009). "Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system". *Cell Res*. **19**:672-82.

Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1999) "Long-term potentiation: a decade of progress?". *Science*. **285**:1870-1874.

Malinow, R., Mainen, Z. F. and Hayashi, Y. (2000). "LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic". *Curr. Opin. Neurobiol*. **10**:352–357.

Mardones, D. M., Andaur, G. A., Varas-Godoy, M., Henriquez, J., F., Salech, F., Behrens, M. I., Couve, A., Inestrosa, N. C., Varela-Nallar, L. (2016). "Frizzled-1 receptor regulates adult hippocampal neurogenesis". *Molecular Brain*. **9**:29.

Marín-Burgin, A. and Schinder, A. F. (2012) "Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning". *Behav Brain Res*. **227**:391-399.

Matthews, G. (2000) "Vesicle fiest at the synapse". *Nature*. 406/24.

Mathews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S. and Schinder, A. F. (2010). "A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis". *J. Comp. Neurol*. **518**:4479–4490.

McAllister, K. (2007). "Dynamic aspect of synapse formation". *Annu. Rev. Neurosci*. **30**:425-450.

Ming, G. L. and Song, H. (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system". *Annu. Rev. Neurosci*. **28**:223–250.

Ming, G. L. and Song, H. (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answer and significant questions". *Neuron*. **70**:687-702.

Moore, C., Guthrie, E., Huang, M. and Taxman, D. (2013). "Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery and assessment of gene knockdown". *Methods Mol Biol*. **629**:141-158.

Nagura, H., Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Takao, K., Tanaka, T., Nishikawa, K., Tamura, H., Shiosaka, S., Suzuki, H., Miyakawa, T., Fujiyoshi, Y., Doi, T. (2012). "Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice". *Molecular brain*. **5**:43.

Nakagawa, T., Futai, K., Lashuel, H., Lo, I. and Okamoto, K. (2004) "Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron*. **44**: 453–467.

Nestler, E., Hyman, S. and Malenka, R. (2001). "Biochemistry of neurotransmitter release. In: Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience. s. I.: Mc Graw-Hill. p. 70-83.

Park, H., Yang, J., Kim, R., Li, Y., Lee, Y., Lee, C., Park, J., Lee, D., Kim, H., and Kim, E. (2015). "Mice lacking the PSD-95-interacting E3 ligase, Dorfin/Rnf19a, display reduced adult neurogenesis, enhanced long-term potentiation, and impaired contextual fear conditioning". *Nature, Scientific Reports*. **5**:16410.

Petralia, R. S., Sans, N., Wang, Y., Wenthold, R. J. (2005). "Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses". *Mol. Cell. Neurosci*. **29**:436-452.

Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C. M., Rossi, D., Lecea, L., Martínez Delgado-García, Soriano, E. (2010). "Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation". *J Neurosci*. **30**:4636–4649.

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2002). "Direct interactions between PSD-95 and stargazing control synaptic AMPA receptor number". *PNAS*. **99**:13902-13907.

Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., Mc Ewen, B. S. and Alvarez-Buylla, A. (2004). "Cells types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus". *J. Comp. Neurol*. **478**:359-378.

Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., and Maletic-Savatic, M. (2010). "Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-couplet phagocytosis". *Cell Stem Cell*. **7**:483-495.

Song, J., Cheon, S., Lee, W. and Lee, J. (2015). "PKA inhibitor H89 (N-[2-p-bromocinnamylamino-ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) attenuates synaptic dysfunction and neuronal cell death following ischemic injury". *Neural Plasticity*. **13**:374520.

Sudhof, T. (1999) "Intracellular trafficking. In: basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspect". 6th ed. s. l.: Lippincot-Raven; p. 175-88.

Suh, H., Deng, W. and Gage, F. H. (2009). "Signaling in Adult Neurogenesis". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**:253–75.

Snyder, J. S., Kee, N. and Wojtowicz, J. M. (2001). "Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus". *J Neurophysiol.* **85**:2423-31.

Steiner, P., Higley, M., Xu, W., Czervionke, B. and Malenka, R. (2008). Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron*. **60**: 788–802.

Steward, O. and Schuman, E. M. (2001). "Protein synthesis at synaptic sites on dendrites". *Ann Rev Neurosc.* **24**:299-325.

Sweet, E., Tseng, C. and Firestein, B. (2011). "To branch or not to branch". *BioArchitecture*. **1**:2,69-73.

Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F. H. (2006). "NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus". *Nature*. **442**:929-933.

Tashiro, A., Zhao, C. and Gage, F. H. (2007). "Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo". *Nature Protocols*. **1**(6):3049-3055.

Tomita, S., Nicoll, R. A. and Bredt, D. S. (2001). "PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity". *J. Cell Biol.* **153**:19-23.

Toni N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H. and Gage, F. H. (2007). "Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus". *Nat Neurosci.* **10**:727-734.

Tosuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., and Hisatsune, T., (2005). "GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells". *Neuron.* **47**:803-815.

Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H., Gage, F. H. and Aboius, D. N. (2010). "Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons". *Proc Natl Acad Sci.* **107**:7963-7968.

van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., Gage, F. H. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice". *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:13427-31.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. and Gage, F. H. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus". *Nature.* **415**:1030-4.

van Zundert, B., Yoshii, A. and Constantine Paton, M. (2004). "Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal". *Trends neurosci.* **27**:428-437.

Varela-Nallar, L., Aranguiz, F. C., Abbott, A. C., Slater, P. G. and Inestrosa, N. C. (2010). "Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease". *Birth Defects Res C Embryo Today.* **90**:284-96.

Varela-Nallar L. and Inestrosa N. C. (2013). "Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis". *Front. Cell. Neurosci.* **7**:100.

Vickers, C., Stephens, B., Bowen, J., Arbuthnott, G., Grant, S. and Ingham, C. (2006). "Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Research*. 89-98.

Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M. and Mori, K. (2000). "Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice". *Neuroreport*. **11**:1991-1996.

Zenisek, D., Steyer, J. A. and Almers, W. (2000). "Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zone". *Nature*. 406/24.

Zhao, C., Deng, W. and Gage, F. H. (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis". *Cell*. **132**:645-660.

Zhao C., Teng E. M., Summers R. G., Jr., Ming G. L. and Gage F. H. (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus". *J. Neurosci*. **26**:3–11.

Zheng, C. Y., Seabold, G. K., Horak, M. and Petralia, R. S. (2011). "MAGUK's, synaptic development, and synaptic plasticity". *Neuroscientist* **17**:493-512.

Zheng, S., Gray, E., Chawla, G., Torben, B., O'Dell, T. and Black, D. (2014) "PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2". *Nat Neurosci*. **15**:381-8.